

**Das endogene Retrovirus HTDV/HERV-K:
Untersuchungen zur Funktion des akzessorischen
Proteins Rec**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Silvia Hahn

aus Marburg

Marburg/Lahn 2004

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am
23.04.2004 angenommen.

Erstgutachterin: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Zweitgutachter: Prof. Dr. Johannes Löwer

Tag der mündlichen Prüfung: 11.05.2004

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Retroviren	1
1.1.1	Morphologie der Viruspartikel	1
1.1.2	Genom und Infektionszyklus der Retroviren	3
1.2	Humane Endogene Retroviren	5
1.2.1	HERV-K	6
1.3	Posttranskriptionelle Regulation der viralen Genexpression	9
1.3.1	Einfach strukturierte Retroviren	10
1.3.2	Komplex strukturierte Retroviren	12
1.3.3	Detaillierte Beschreibung der Struktur und Funktion posttranskriptionell regulatorischer Retrovirus-Proteine	13
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	19
2	ERGEBNISSE	20
2.1	Charakterisierung des RcRE <i>in vitro</i>	20
2.2	Crm1 ist der nukleäre Exportrezeptor von Rec	25
2.2.1	Der Rec vermittelte RNA Export kann durch „Pendel“-Proteine, die das NES von Rev oder Rex tragen blockiert werden	25
2.2.2	Crm1 bindet an Rec in Gegenwart von RanGTP	30
2.3	Bestimmung des nukleären Exportsignals von Rec	32
2.3.1	Untersuchung von Mutanten, bei denen die erste oder die zweite leucinreiche Domäne mutiert ist	32
2.3.2	Feinkartierung der ersten und zweiten leucinreichen Domäne	34
2.3.3	RNA Exportaktivität der Rec-LRD Punktmutanten	35
2.3.4	Lokalisation der Rec-LRD Punktmutanten	37
2.3.5	Der GFP-Fusionsanteil verursacht bei Rec-LRD1mutIII und Rec-LRD2mutIII einen Funktionsverlust	40
2.3.6	Die Punktmutationen führen nicht zum Verlust der Exportrezeptorbindung	42

2.3.7	Punktmutationen im Bereich der leucinreichen Domänen führen nicht zum Verlust des Crm1-Bindevermögens von Rec	44
2.3.8	Multimerisierung der LRD-Punktmutanten mit Rec-NLSmut-GFP	46
2.3.9	RcRE-Bindung der Rec-LRD Punktmutanten	49
2.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	52
3	DISKUSSION	54
3.1	Die Bindung von Rec an sein responsives Element erfolgt über eine komplexe, gefaltete RNA-Struktur	54
3.2	Crm1 ist am Rec abhängigen RNA Export beteiligt	56
3.3	Einfluss von N- und C-terminalen Fusionsanteilen auf die Funktionalität von Rec	58
3.4	Bestimmung des NES, detaillierte Untersuchung der Funktion der ersten und zweiten leucinreichen Domäne	59
3.4.1	Sequenzvergleich der leucinreichen Domänen von Rec mit leucinreichen Domänen anderer viraler und zellulärer Proteine	59
3.4.2	Das nukleäre Exportsignal ist im Bereich der zweiten leucinreichen Domäne lokalisiert	60
3.4.3	Multimerisierung bei Rec	65
3.4.4	Leucin-Reste im Bereich beider leucinreicher Domänen sind für die Bindung an das RcRE von Bedeutung	69
3.5	Modellvorstellung über die Funktionsweise von Rec	72
3.6	Vergleich von Rec/RcRE mit Rev/RRE und Rex/RxRE	74
4	ZUSAMMENFASSUNG	76
5	MATERIAL UND METHODEN	78
5.1	Allgemeine Materialien und Geräte	78
5.2	Bakterienkultur	79
5.2.1	Medien und Chemikalien	79
5.2.2	Bakterienstämme	80
5.2.3	Anlegen einer Übernachtskultur	80
5.2.4	Erzeugung kompetenter Bakterien	80

5.2.5	Transformation rekombinanter DNA	81
5.2.6	Selektion positiver Klone	81
5.2.7	Plasmid-Minipräparation	82
5.2.8	Plasmid-Midi- und Maxipräparation	82
5.2.9	Einfrieren von Bakterien	82
5.3	DNA-Techniken	83
5.3.1	Restriktion von Plasmid-DNA	83
5.3.2	Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel	83
5.3.3	DNA Extraktion aus Agarosegelen	84
5.3.4	Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNA	84
5.3.5	Ligation von DNA	85
5.3.6	Phenol-Chloroform-Extraktion	85
5.3.7	Fällung von DNA	86
5.3.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1985)	86
5.3.9	“Assembly” PCR	87
5.4	Zellkultur	88
5.4.1	Geräte und Materialien	88
5.4.2	Medien und Chemikalien	88
5.4.3	Zellen	89
5.4.4	Halten und Vermehren der Zelllinie	89
5.4.5	Transfektionen	89
5.5	Proteintechniken	91
5.5.1	Proteininduktion	91
5.5.2	Aufreinigung nativer Proteine über Kationen-Austausch-Chromatographie	91
5.5.3	Proteinbestimmung (nach Bradford)	92
5.5.4	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	93
5.5.5	Coomassie-Blue-Färbung	94
5.5.6	Proteinanalysen	95
5.5.7	Immunpräzipitation	98
5.6	RNA-Techniken	99
5.6.1	<i>In vitro</i> Transkription	99
5.6.2	<i>In vitro</i> Transkription radioaktiv markierter Sondenmoleküle	100
5.6.3	RNA-Gelshift Assay	100
5.7	Klonierungen	102
5.7.1	Oligonukleotide (Primer)	102

5.7.2	Plasmide und Vektoren	103
6	LITERATURVERZEICHNIS	107
7	ANHANG	116
7.1	Abkürzungsverzeichnis	116
7.2	Eigene Publikationen und Kongressbeiträge	120
	LEBENS LAUF	121
	DANKSAGUNG	123
	ERKLÄRUNG	124

1 Einleitung

1.1 Retroviren

Retroviren wurden Anfang des 20. Jahrhunderts im Zuge der Erforschung von Tumorerkrankungen bei Hühnern entdeckt. Der Wissenschaftler Peyton Rous fand heraus, dass sich bei Verwendung zellfreier Extrakte aus Geflügelsarkomen diese Tumorerkrankung auf gesunde Hühner übertragen lässt. Das dafür verantwortliche und aus diesen Extrakten isolierte Retrovirus wurde nach seinem Entdecker Rous-Sarkom-Virus (RSV) genannt. Die Verbindung von Retroviren mit Tumorerkrankungen und die Entdeckung von tumorinduzierenden Retroviren bei höheren Säugetieren intensivierte die Suche nach pathogenen, krebsverursachenden Retroviren beim Menschen. Bisher wurden jedoch nur zwei humanpathogene Retroviren identifiziert. Das humane T-Zell Leukämie Virus ruft beim Menschen die adulte T-Zell Leukämie (ATL) hervor, eine Erkrankung, die in der akuten Form innerhalb von sechs Monaten zum Tod führen kann. Das zweite humanpathogene Retrovirus ist das HI-Virus (human immunodeficiency virus), der Erreger der erworbenen Immunschwäche AIDS.

Charakteristisches Merkmal aller Retroviren ist der Besitz des Enzyms Reverse Transkriptase. Diese kann das einzelsträngige virale RNA Genom in doppelsträngige DNA umwandeln. Durch ein zweites Enzym, die Integrase, wird die provirale DNA in das Wirtsgenom integriert. Im Laufe der Evolution ist es in sehr seltenen Fällen zu Infektionen der Keimbahn gekommen. Damit werden Retroviren als einzige Virusfamilie nicht nur horizontal, in Form von infektiösen Viruspartikeln, sondern auch vertikal als endogener Bestandteil des Genoms der Keimbahnzellen übertragen (Coffin, 1991) .

1.1.1 Morphologie der Viruspartikel

Die infektiösen Viruspartikel der verschiedenen Retroviren haben einen Durchmesser von etwa 120 nm und zeigen einen einheitlichen Aufbau. Das einzelsträngige RNA Genom, das in zwei Kopien vorliegt, wird von einem Viruskapsid umgeben. Je nach Virustyp kann dieses eine ikosaedrische oder konische Form haben. Im Inneren des Kapsids befinden sich

neben dem Virusgenom, das im Komplex mit den Nukleokapsidproteinen vorliegt, noch die Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR). Das Kapsid wird von der Hüllmembran, einer Lipiddoppelschicht, welche von der Plasmamembran der Wirtszelle abstammt, umgeben. In die Hüllmembran eingelagert sind die virusspezifischen Glykoproteine, die sich in die Oberflächen- und die Transmembranglykoproteine aufspalten. Über die Glykoproteine erfolgt der Kontakt zu den zellulären Rezeptoren und durch sie wird die Fusion mit der Zielzelle vermittelt. An die Innenseite der Hüllmembran sind die Matrixproteine angelagert, die meist über aminoterminal angefügte Myristinsäurereste an der Hüllmembran verankert sind.

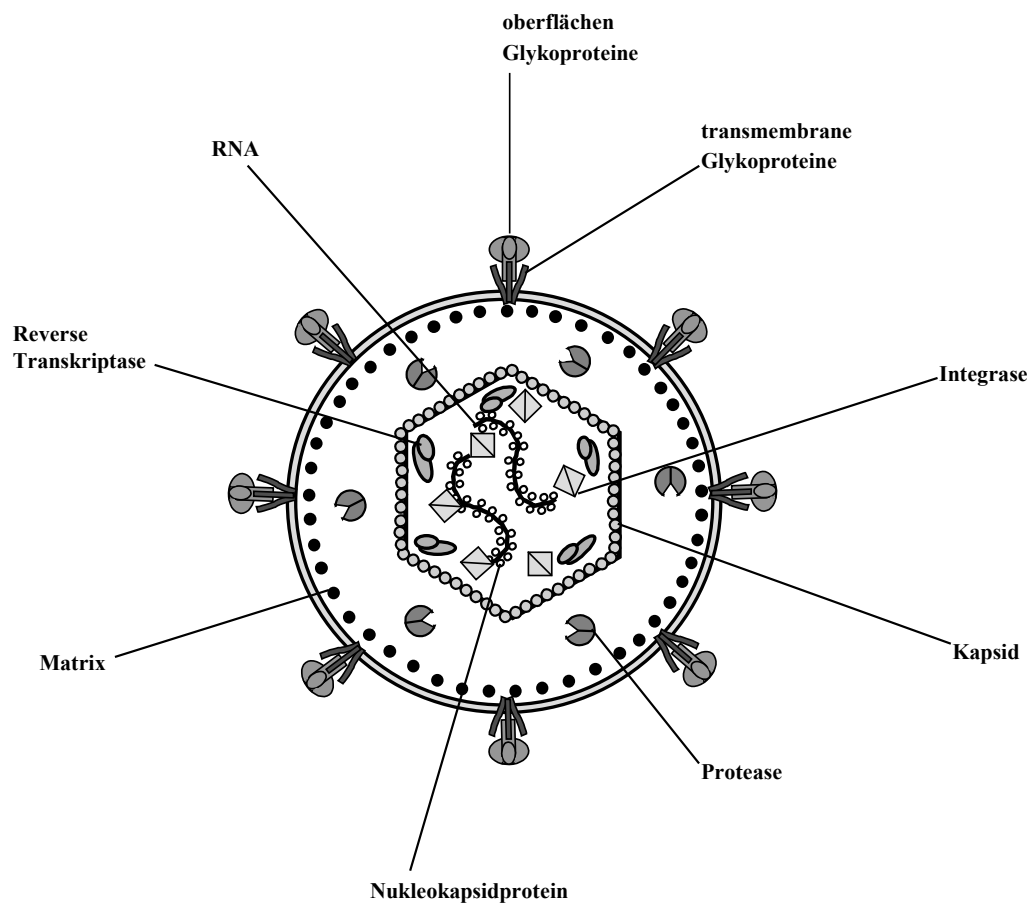


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines Virions (nach (Coffin, 1992)).

1.1.2 Genom und Infektionszyklus der Retroviren

Retroviren besitzen ein einzelsträngiges Positivstrang-RNA-Genom, das analog zu eukaryotischer mRNA am 5' Ende eine Cap-Struktur und am 3' Ende eine Polyadenylierung trägt. Alle infektiösen Retroviren kodieren für die Produkte **Gag** (gruppenspezifisches Antigen), **Pol** (enzymatische Aktivitäten) und **Env** (Glykoproteine). Zu den Gag-Produkten zählen die Matrix- (MA), Capsid- (CA) und Nucleocapsidproteine (NC), die als gemeinsames Gag-Vorläuferprotein synthetisiert werden. Erst im Verlauf der Virusmorphogenese wird das Polyprotein von der viralen Protease (PR) in seine Einzelkomponenten gespalten. Das Proteasegen befindet sich in der 5' Region des *pol*-Gens und überlappt häufig mit den Sequenzen für das NC-Protein, jedoch wird das Pol-Protein meist von einem anderen Leserahmen translatiert. Neben der Protease kodiert das *pol*-Gen noch für die Enzyme Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN). Auch die Pol-Produkte werden als Polyprotein synthetisiert, wobei es sich hierbei um ein Gag/Pol-Fusionsprotein handelt. Die Spaltung der Gag/Pol-Vorläuferproteine in die einzelnen Komponenten erfolgt ebenfalls durch die virale Protease.

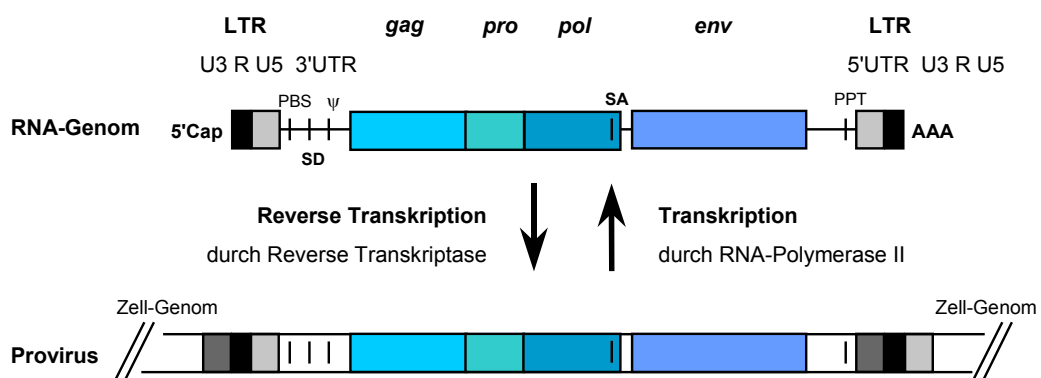


Abb. 1.2 Vereinfachte, schematische Darstellung des viralen RNA-Genoms und des Genoms des Provirus nach Integration ins Wirtsgenom (Schema nicht maßstabsgetreu). Die abgebildeten Sequenzelemente und Gene sind bei allen Retroviren zu finden. AAA: Polyadenylierung, 5'Cap: 7-Methyl-Guanosin-5'-triphosphat, *env*: Envelope Gen, *gag*: gruppenspezifisches Antigen, LTR: Long Terminal Repeat, PBS: Primer Binding Site, *pol*: Polymerase Gen, *pro*: Protease Gen, ψ : Verpackungs-Signal (Psi), PPT: Poly-Purin-Tract, R: terminale Redundanz, U3: Unique 3' End, U5: Unique 5' End, 3'UTR: 3'Untranslated Region, 5'UTR: 5'Untranslated Region (Leader).

Die Reverse Transkriptase ist für das Umschreiben des einzelsträngigen RNA-Genoms in doppelsträngige DNA verantwortlich. Die RT ist sowohl eine RNA-abhängige als auch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase mit RNase H Aktivität. Die Integration der als Provirus bezeichneten DNA erfolgt durch die Integrase, die sowohl Endonuklease- als

auch Ligasefunktion besitzt. Das *env*-Gen (**en**velope) kodiert für die Glykoproteine, die in die Virushülle eingelagert sind. Es handelt sich dabei um die Oberflächen- und Transmembranglykoproteine, die ebenfalls als gemeinsames Vorläuferprotein von einer einfach gespleißten mRNA translatiert werden. Bei komplexen Retroviren wie HIV oder HTLV findet man zusätzlich zu den *gag*-, *pol*- und *env*-Genen noch weitere Gene, die für Proteine mit regulatorischen Funktionen kodieren. Die Expression dieser Proteine erfolgt meist von mehrfach gespleißten Transkripten.

Das Virusgenom wird an beiden Seiten von regulatorischen Sequenzen flankiert, die bei allen Retroviren gleich aufgebaut sind (Abb. 1.2). Direkt an die 5' Cap-Struktur schließt die R-Region (R=redundant) an, die für die reverse Transkription von Bedeutung ist. Die R-Region liegt in identischer Form auch am 3' Ende vor. Am 5' Ende schließt sich an die R-Region die U5-Region (U=unique) an. Anschließend folgt die 18 Nukleotide umfassende Primer-Bindungsstelle (PBS), die über Basenpaarung mit dem 3' Ende eines spezifischen tRNA-Moleküls komplexiert vorliegt. Das tRNA-Molekül liefert den Primer für die Erststrang-DNA Synthese der Reversen Transkription. Zwischen PBS und *gag*-Gen befindet sich die Leader-Region, die sich aus Spleißdonor- und ψ -Stelle zusammensetzt. Die Spleißdonorstelle wird für die Herstellung aller gespleißten mRNAs verwendet. Die ψ -Stelle dient als Verpackungssignal für das RNA-Genom. Stromabwärts vom *env*-Gen schließt sich der Polypurintrakt (PP) an, eine Folge von mindestens neun Adenosin- oder Guaninresten, die bei der Zweitstrangsynthese der reversen Transkription von Bedeutung sind. Der Polypurintrakt geht schließlich in die U3-Region über, die Enhancer und Promotor Sequenzen enthält. An die U3-Region schließt sich dann erneut die R-Region an, die auch das Polyadenylierungssignal (AAUAAA) beinhaltet, das sich üblicherweise mehr als 20 Nukleotide stromaufwärts vom Transkriptionsende befindet. Nur wenn die R-Region sehr kurz ist, ist diese Sequenz in der U3-Region lokalisiert. Die R-Region geht dann in den PolyA Schwanz über, der aus 200-300 Adenosinresten besteht. Durch das Umschreiben der RNA in doppelsträngige DNA entstehen an den Enden des Provirusgenoms identische Sequenzabschnitte, die als **long terminal repeats (LTRs)** bezeichnet werden. Die LTRs setzen sich aus der U3-, R-, und U5-Region zusammen und beinhalten alle *cis*-aktiven Elemente (Promotor, Enhancer), die für die Regulation der viralen Genexpression erforderlich sind.

Als Bestandteil des Wirtsgenoms wird die integrierte provirale DNA von der zellulären Transkriptionsmaschinerie abgelesen und die viralen Strukturproteine, die Hüllproteine, die Enzyme und die genomische RNA gebildet. Der Zusammenbau der Viruspartikel

erfolgt an der Zytoplasmamembran der Zelle, wo die viralen Partikel durch Knospung freigesetzt werden.

1.2 Humane Endogene Retroviren

Wie bereits erwähnt, kommen Retroviren nicht nur in Form von exogenen infektiösen Viruspartikeln vor, sondern auch als integrierter Bestandteil des Genoms. **Humane endogene Retroviren (HERVs)** sind vor etwa 10-40 Millionen Jahren wahrscheinlich durch die Infektion von Keimbahnzellen von Primatenvorläufern mit exogenen Retroviren entstanden und somit in das Genom aller Zellen der Primaten und damit auch des Menschen integriert (Ono, 1986; Steinhuber et al., 1995). Aufgrund von Mutationen oder Deletionen in den kodierenden Sequenzen, die sich im Laufe von Millionen von Jahren angesammelt haben, sind die rezenten HERVs jedoch nicht infektiös. Allerdings machen die verschiedenen endogenen Retroviren und die von ihnen abgeleiteten Sequenzen (solitäre LTRs und SVAs), die in einer Anzahl von einer bis zu einigen zehntausend Kopien vorkommen, bis zu 10 % des menschlichen Genoms aus (Leib-Mösch et al., 1993). Obwohl endogene Retroviren nicht infektiös sind, können sie doch zahlreiche sowohl positive als auch negative Auswirkungen auf den Wirtsorganismus haben, von denen einige im Folgenden genannt werden. So kann es abhängig vom Integrationsort der viralen Sequenzen zur Aktivierung zellulärer Gene durch virale Promotor oder Enhancer Elemente kommen oder aber, wenn die Integration innerhalb eines Gens erfolgte, auch zum Funktionsverlust des betroffenen Gens (Kobayashi et al., 1998; Ostertag et al., 2003). Eine zentrale Bedeutung kommt dabei den solitären LTRs zu, die regulatorische Elemente (Enhancer, Promotor, Polyadenylierungssignal) tragen können und in sehr hoher Kopienzahl im Genom vertreten sind. Aufgrund der Aktivität der Reversen Transkriptase und der Integrase können *de novo* Insertionen retroviraler Elemente durch Retrotransposition nicht ausgeschlossen werden, wenngleich in jüngerer Zeit über solche Ereignisse beim Menschen nichts bekannt ist (Löwer, 1999). *De novo* Insertionen bergen in zweifacher Hinsicht ein potentiellies Risiko zur Krebsentstehung, da die Integration viraler Sequenzen sowohl die Aktivierung von Proto-Onkogenen als auch die Inaktivierung von Tumor-Suppressorgenen zur Folge haben kann (Löwer, 1999). Die Integration von retroviralen Elementen hatte jedoch nicht immer Krankheiten verursachende Auswirkungen gehabt. Beispielsweise führte die Integration von HERV-E Elementen in die

Promotor-Region des Amylasegens dazu, dass Amylase nicht nur im Pankreas, sondern auch in der Speicheldrüse exprimiert wird (Samuelson et al., 1990).

Auch eine Schutzfunktion endogener retroviraler Proteine wird diskutiert. Es ist durchaus denkbar, dass durch die Expression endogener retroviraler Proteine ein Schutz des Organismus vor einer Infektion mit nahverwandten exogenen Retroviren hervorgerufen werden kann (Löwer et al., 1996). Bei der Maus konnte gezeigt werden, dass eine endogene Expression des Sag-Proteins (akzessorisches Protein mit Superantigen-Funktion) von MMTV eine Infektion mit exogenem MMTV gleichen Subtyps verhindert (Golovkina et al., 1992)

Die Expression der meisten HERVs ist gewebespezifisch. Sie sind überwiegend in Keimbahnzellen, embryonalem Gewebe und der Plazenta vorzufinden. Dabei kommt der Expression des HERV-W Env (Env-W) Proteins in plazentalem Gewebe eine außergewöhnliche Bedeutung zu. Es konnte gezeigt werden, dass das Env-W Protein in humanen Trophoblasten stark exprimiert wird und maßgeblich an der Trophoblasten-Zellfusion und Differenzierung zum Syncytiotrophoblasten beteiligt ist (Frendo et al., 2003). Sollte sich die Präsenz des Env-W Proteins als existentiell für die Syncytiotrophoblastenentstehung herausstellen, so würde dies bedeuten, dass die Infektion von HERV-W eine zentrale Rolle bei der Evolution der höheren Primaten gespielt hat.

1.2.1 HERV-K

Wie die meisten HERV Familien wurde auch HERV-K durch Hybridisierung humaner genomischer DNA mit DNA-Sonden des *pol*-Gens (MMTV bzw. IAPs [intrazisternalen A-Typ Partikeln] des Syrischen Hamsters) unter wenig stringenten Bedingungen gefunden (May and Westley, 1986; Ono, 1986). Charakteristisch für die HERV-K Familie ist eine Primerbindestelle, die mit einer tRNA für die Aminosäure Lysin komplexiert vorliegt, weshalb dem Akronym HERV das Suffix K (Einbuchstaben-Code für Lysin) angefügt wurde. Die HERV-K Familie kommt mit 30-50 Kopien im haploiden Genom des Menschen und aller Altweltaffen vor. Zusätzlich findet man noch ca. 10.000 solitäre LTRs im menschlichen Genom verteilt. HERV-K, und dies stellt eine Besonderheit dar, kodiert als einzige endogene Retrovirus Familie für virale Partikel (Boller et al., 1993; Löwer et al., 1993a). Diese Partikel wurden in Teratokarzinom-Zelllinien nachgewiesen (Boller et al., 1983; Löwer et al., 1984) und in Anlehnung daran **human teratocarcinoma derived virus** (HTDV) Partikel genannt.

1.2.1.1 Genomische Organisation von HERV-K

HERV-K besitzt offene Leserahmen für die klassischen viralen Proteine Gag, Pro, Pol und Env, die wie bei den exogenen Retroviren zunächst als Polyproteine translatiert und später in die einzelnen Komponenten gespalten werden. Zusätzlich findet man auf einer zweifach gespleißten mRNA noch einen weiteren offenen Leserahmen, von dem das kleine regulatorische Protein Rec (regulator of expression encoded by *corf*) exprimiert wird (Löwer et al., 1995) (Abb. 1.3).

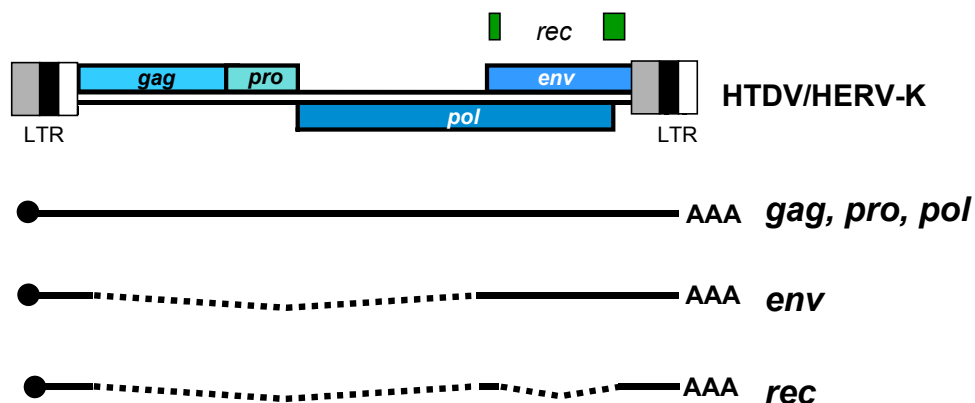


Abb. 1.3: Genomische Organisation von HERV-K (verändert nach Löwer, 1995). Neben den klassischen retroviralen Proteinen kodiert HERV-K noch für ein weiteres Protein mit posttranskriptioneller regulatorischer Funktion.

Da für die Entstehung des ersten Exons von Rec der gleiche Spleißdonor (SD) und Spleißakzeptor verwendet wird wie bei der Herstellung der subgenomischen env-mRNA, stimmt das erste Exon von Rec mit dem 5' Ende von Env überein. In einem zweiten Spleißereignis wird das zweite Exon angefügt, das aufgrund eines Leserasterschubes nicht mit dem env-Leserahmen identisch ist.

1.2.1.2 Vorkommen von HERV-K Transkripten und Expression der viralen Proteine

In gesundem Gewebe von Plazenta, Testis, Niere und PBMCs können HERV-K Transkripte nur mit Hilfe von äußerst sensitiven Nachweismethoden wie der RT-PCR detektiert werden (Denner, 1995). In testikulärem Tumorgewebe hingegen ist die Expression von HERV-K Transkripten stark hochreguliert (Löwer et al., 1993b). Wie

bereits erwähnt, kommt es in diesem Tumorgewebe zur Ausbildung von HTDV-Partikeln. Obwohl HERV-K offene Leserahmen für alle viralen Proteine (Gag, Pro, Pol und Env) besitzt und es zur Ausbildung viraler Partikel kommt, ist HERV-K nicht infektiös. Die elektronenmikroskopische Analyse lieferte einen ersten Hinweis auf mögliche Ursachen. HERV-K Partikel besitzen kein kollabiertes Kapsid, das als Anzeichen der Virusreifung gewertet wird. Des Weiteren scheinen die Partikel im Knospungsstadium „eingefroren“ zu sein (Boller et al., 1983; Löwer et al., 1984). Für die fehlende Infektiosität der Viruspartikel gibt es unterschiedliche Erklärungsmöglichkeiten. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass zu wenig *env*-mRNA gebildet wird. Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, dass man in Teratokarzinom-Zelllinien kaum Env Protein nachweisen kann. Es ist jedoch auch denkbar, dass die Prozessierung des Env Polyproteins in die Oberflächen- und Transmembranglykoproteine defekt ist (Tonjes et al., 1997; Tönjes et al., 1997). Eine unvollständige Prozessierung des Gag-Vorläuferproteins könnte ebenfalls eine Erklärung für die fehlende Infektiosität sein.

Das HERV-K Gag Protein eignet sich als Surrogatmarker bei der Erkennung von Hodenkrebs. Bei 63% der Hodentumorpatienten kommt es zur Antikörperbildung gegen HERV-K Gag, während dies bei gesunden Menschen nur bei 3% der Fall ist (Sauter et al., 1995).

1.2.1.3 Bedeutung von HERV-K

Wie bereits erwähnt, ist HERV-K die einzige endogene Virusfamilie, die Leserahmen für alle klassischen retroviralen Proteine besitzt. Zwar konnte man HERV-K bislang keine Funktion zuordnen, jedoch muss man sich die Frage stellen, warum ein Virus über einen Zeitraum von über 30 Millionen Jahren nicht vollständig inaktiviert wird, wenn es keine Funktion für den Organismus hat. Schaut man sich z.B. die proviralen Sequenzen von HERV-W an, stellt man fest, dass abgesehen vom *env*-Gen, dass von entscheidender Bedeutung für die Syncytiotrophoblastenbildung ist, alle anderen viralen Gene durch Mutationen defekt sind. Auch bei den anderen HERV-Familien sind die meisten Gene durch Mutationen inaktiviert.

1.3 Posttranskriptionelle Regulation der viralen Genexpression

Als Bestandteil des Wirtsgenoms wird die provirale DNA von der zellulären Transkriptionsmaschinerie abgelesen. Bei der eukaryotischen Transkription liegt die RNA nach der Transkription als Primärtranskript im Zellkern vor. Das primäre RNA-Transkript zeigt die gleiche Organisation wie sein Gen. Neben den kodierenden Sequenzen, den Exons, findet man zahlreiche nicht-kodierende Sequenzen, die sogenannten Introns. Vor dem Transport ins Zytoplasma durchläuft die prä-mRNA noch zahlreiche Prozessierungsschritte. Schon während der Transkription wird das 5' Ende durch Anhängen einer Cap-Struktur, die aus einem 7-Methylguanosin-Rest besteht, modifiziert. An das 3' Ende wird ein PolyA-Schwanz angehängt, der aus 200-300 Adenosin-Resten besteht. Kurz vor der Stelle, an der die Polyadenylierung erfolgt, befindet sich eine hochkonservierte Sequenz (AAUAAA), die sowohl als Signal für die 3' Termination als auch für die Polyadenylierung fungiert. Der PolyA-Schwanz dient zur Stabilisierung der RNA und ist für den Export der Transkripte aus dem Kern ins Zytoplasma von Bedeutung (Atwater et al., 1990). Im Verlauf der Prozessierung werden die Intronsequenzen entfernt und die kodierenden Sequenzen zu einem Ganzen zusammengesetzt (Abb. 1.4). Die Entfernung der Introns erfolgt durch die Spleißosomen, die sich aus Proteinen und Ribonukleoproteinen zusammensetzen. Untereinheiten des Spleißapparates erkennen und binden an kurze Konsensussequenzen, die sich an der Exon-Intron-Grenze und innerhalb des Introns, an der sogenannten Verzweigungsstelle („branch-site“), befinden. Die äußeren Enden eines Introns sind hochgradig konserviert. Ein Intron beginnt mit dem Dinukleotid GT und endet mit dem Dinukleotid AG. Aufgrund der unterschiedlichen Sequenzen wird dem Intron eine „Richtung“ verliehen. Das 3' Ende wird häufig auch als Spleißdonor (SD) und das 5' Ende als Spleißakzeptor (SA) bezeichnet. In zwei aufeinanderfolgenden Umesterungs-Reaktionen werden die Intronsequenzen entfernt und die Exons miteinander verknüpft. Erst nach Modifikation der 5' und 3' Enden und nach Beenden des Spleißvorgangs werden die Transkripte von nukleären Exportrezeptoren erkannt und ins Zytoplasma transportiert. Für mRNA Transkripte ist dies gewöhnlich der Exportrezeptor TAP (Kang and Cullen, 1999; Weis, 2002). Da die viralen Transkripte von dem zellulären Transkriptionsapparat hergestellt werden, durchlaufen sie die gleichen Prozessierungsschritte wie die zellulären Transkripte. Alle retroviralen Vollängentranskripte enthalten Spleißsignale für die Entfernung von mindestens einem Intron. Spleißdonor und Spleißakzeptor stimmen mit der Konsensussequenz überein.

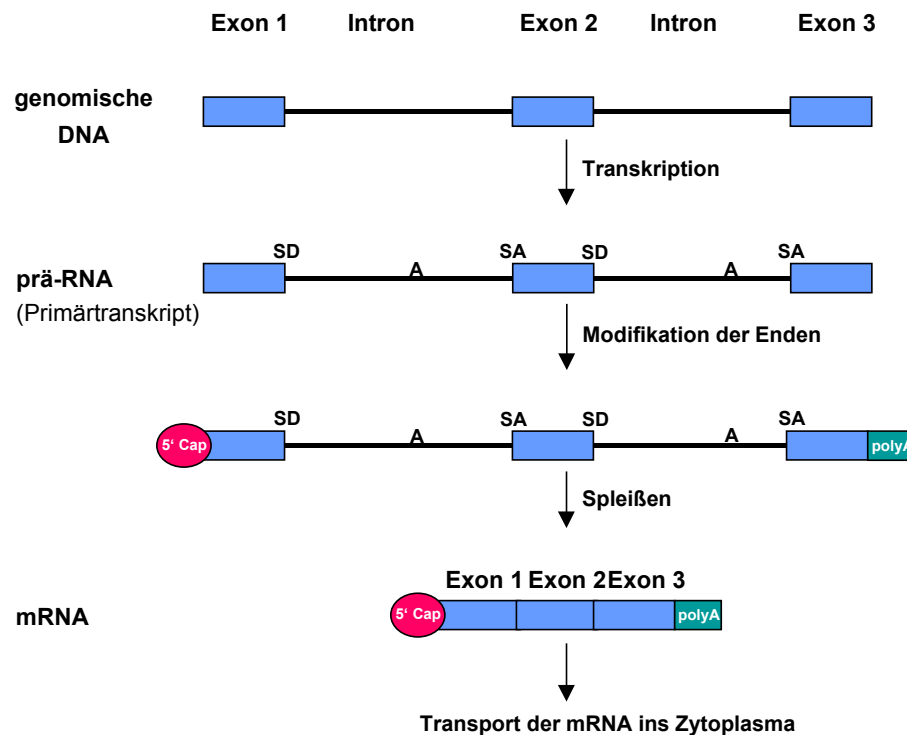


Abb. 1.4: Übersicht über die einzelnen Schritte der RNA Prozessierung: Schon während der Transkription werden das 5' und 3' Ende durch Anhängen einer 5' Cap-Struktur und eines PolyA-Schwanzes modifiziert. Des weiteren werden die nicht-kodierenden Sequenzen, die Introns, entfernt und die Exons zusammengesetzt. Erst nach Beendigung der RNA-Prozessierung werden die Transkripte ins Zytoplasma transportiert. SD: Spleißdonor, SA: Spleißakzeptor, A:

1.3.1 Einfach strukturierte Retroviren

Einfach strukturierte Retroviren, zu denen das murine Leukämie Virus (MLV) und das Mason-Pfizer-Monkey-Virus (MPMV) zählen, kodieren mit wenigen Ausnahmen nur für die klassischen retroviralen Struktur- und Nichtstrukturproteine Gag, Pro, Pol und Env (Coffin, 1992) (Abb. 1.5). Allen einfach strukturierten Retroviren ist gemeinsam, dass sie nur zwei Arten von mRNAs bilden: die Vollängen mRNA, von der die Proteine Gag, Pro und Pol translatiert werden und die auch als virales Genom dient und die subgenomische *env*-mRNA.

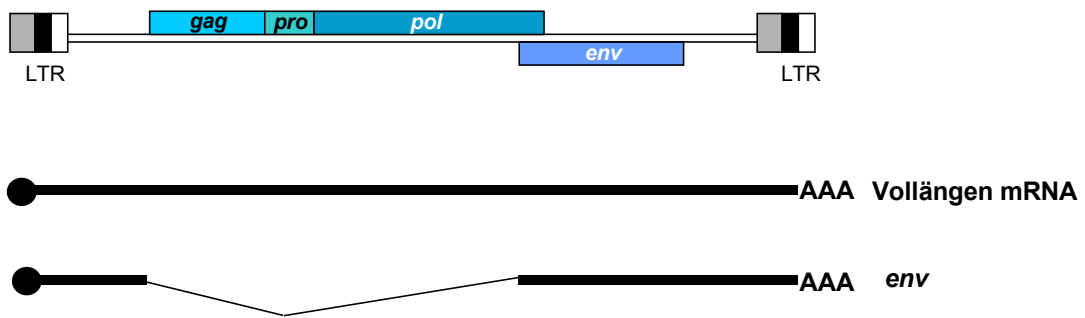


Abb. 1.5: Darstellung des Expressionsmusters einfacher Retroviren am Beispiel von MPMV (Erklärung im Text)

Sowohl für die Verpackung des Genoms als auch für die Translation der Strukturproteine muss das Vollängentranskript ungespleißt aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert werden. Da in eukaryotischen Zellen die mRNAs vor dem nukleo-zytoplasmatischen Transport einem intensiven Spleißprozess unterliegen, mussten Retroviren Mechanismen entwickeln, mit denen sie sicherstellen, dass neben der subgenomischen *env*-mRNA ausreichende Mengen an ungespleißter Vollängen-RNA im Zytoplasma vorliegen. Bei den einfach strukturierten Viren, z.B. Rous-Sarkom-Virus (RSV) und Mason-Pfizer-Monkey-Virus (MPMV) sind diese regulatorischen Mechanismen genauer untersucht worden. RSV reguliert das Verhältnis von ungespleißter zu gespleißter RNA zum einen über Mechanismen, die das Spleißen verhindern (suboptimale Spleißstellen, negative regulatorische Sequenzen) und zum anderen über den aktiven Export der viralen Vollängentranskripte ins Zytoplasma. Bei suboptimalen Spleißstellen weichen die Sequenzen an der 3'-Spleißstelle und/oder an der Verzweigungsstelle („branch-site“) von der Spleißkonsensussequenz ab (Jordon et al., 1990). Die Folge ist, dass diese Spleißstellen hin und wieder von den Spleißosomen nicht erkannt werden. Inhibitorische Sequenzen (NRS) unterdrücken ebenfalls den Spleißprozess. Sie sind am wirkungsvollsten in der Nähe der 5'-Spleißstelle (Arrigo and Beemon, 1988). NRS setzen sich aus Sequenzen zusammen, die Ähnlichkeiten zu den Spleißkonsensussequenzen zeigen und von bestimmten Untereinheiten des Spleißapparates erkannt und gebunden werden. Durch Bindung von Komponenten des Spleißosoms an diese „Mini-Exons“ wird der Aufbau eines Spleißkomplexes an der in der Nähe gelegenen 5'-Spleißstelle verhindert (McNally and McNally, 1996). Die Unterdrückung des Spleißprozesses alleine reicht aber nicht aus, um ausreichende Mengen an ungespleißter viraler RNA im Zytoplasma zu erhalten. Es

musste ein Mechanismus entwickelt werden, der einen effizienten nukleären Export der viralen Transkripte gewährleistet. Dazu befinden sich auf der viralen mRNA *cis*-aktive, stark gefaltete Strukturen, die „Constitutive Transport Elements“ (CTEs) (Bray et al., 1994; Ernst et al., 1997). An diese Strukturen bindet der zelluläre Exportrezeptor TAP, der dann für einen effizienten Transport der viralen Transkripte ins Zytoplasma sorgt (Segref et al., 1997).

1.3.2 Komplex strukturierte Retroviren

Komplex strukturierte Retroviren, wie das Humane Immundefizienz Virus (HIV), kodieren neben den klassischen viralen Proteinen noch für zahlreiche weitere Proteine mit überwiegend regulatorischen Funktionen (Abb. 1.6). Da auch die komplexen Retroviren nur über einen Promotor verfügen, sind weitere Spleißereignisse für die Herstellung der zusätzlichen Transkripte erforderlich. Die Expression der akzessorischen Proteine erfolgt von mehrfach oder alternativ gespleißten Transkripten. Auch die komplexen Retroviren verfügen über posttranskriptionelle Regulationsmechanismen die sicherstellen, dass ausreichende Mengen an Vollängen-RNA, subgenomischer *env*-mRNA und mehrfach gespleißter RNA im Zytoplasma vorliegen.

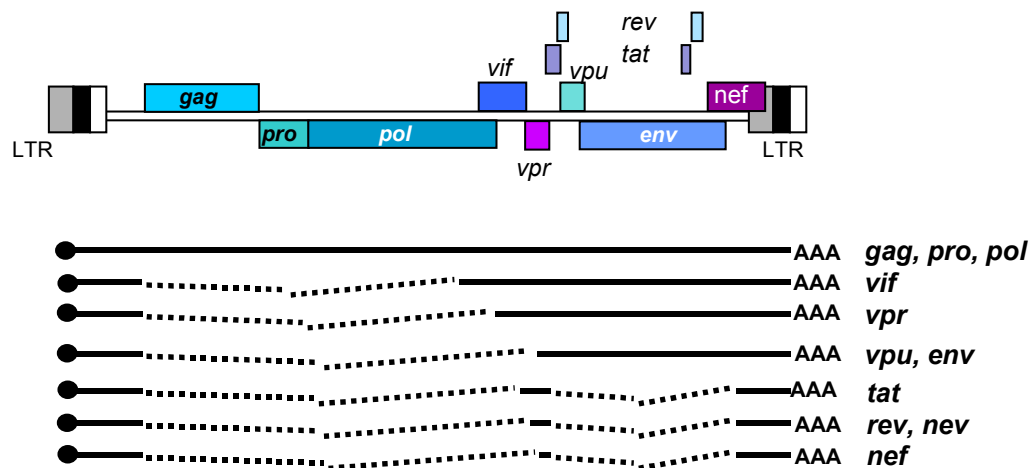


Abb. 1.6: Darstellung eines Expressionsmusters komplexer Retroviren am Beispiel von HIV (Erklärung im Text, Abbildung verändert nach Felber und Pavlakis, 1993)

Anhand des komplexen Retrovirus HIV sollen im Folgenden diese Regulationsmechanismen näher erläutert werden. Bei HIV und anderen komplexen

Retroviren findet man zwei Klassen von Genen: die frühen Gene, die überwiegend für die regulatorischen Proteine kodieren und die späten Gene, die für die Strukturproteine kodieren. In der frühen Phase der Virusvermehrung sind zunächst nur die mehrfach gespleißten viralen Transkripte im Zytoplasma zu finden. Der nukleo-zytoplasmatische Transport dieser Transkripte erfolgt über den zellulären, TAP-vermittelten mRNA Exportweg. Von diesen mehrfach gespleißten RNAs wird bei HIV u.a. das regulatorische Protein Rev (regulator of expression of yirion proteins) exprimiert. Rev ist für das Umschalten von der frühen zur späten Phase der Virusvermehrung verantwortlich. Liegt das Protein in ausreichenden Konzentrationen vor, vermittelt es den Export der viralen ungespleißten und unvollständig gespleißten mRNA aus dem Kern ins Zytoplasma. Dabei bindet Rev an eine spezifische RNA-Struktur, das Rev responsive Element (RRE), das sich auf den primären viralen Transkripten befindet. Obwohl die primäre Funktion von Rev der Export der viralen ungespleißten und unvollständig gespleißten Transkripte ist, übt Rev auch einen Einfluss auf den Spleißprozess und die mRNA Stabilität aus. In einem *in vitro* Experiment ist gezeigt worden, dass durch Bindung von Rev an sein RRE das Spleißen unterdrückt werden kann (Kjems et al., 1991). Vermutlich wird durch die Bindung von Rev an sein RRE der Zusammenbau eines Spleißosoms an einer in der Nähe gelegenen Spleißstelle verhindert (Kjems and Sharp, 1993). Bei komplexen Retroviren findet man auf der RNA *cis*-aktive inhibitorische Sequenzen (CRS oder INS), die zur Retention und Degradierung der RNA im Kern führen. Bei HIV hat man solche Sequenzen innerhalb von *gag*, *pol* und *env* gefunden (Maldarelli et al., 1991; Nasioulas et al., 1994; Schwartz et al., 1992). Durch Bindung von Rev an sein RRE werden diese Elemente in ihrer Wirkung unterdrückt und der Export der viralen RNA vermittelt.

1.3.3 Detaillierte Beschreibung der Struktur und Funktion posttranskriptionell regulatorischer Retrovirus-Proteine

1.3.3.1 Rev/RRE

Struktur und Funktion des regulatorischen Proteins Rev sind sehr gut untersucht. Dabei wurde folgendes Model für die Funktion von Rev entwickelt (Abb. 1.7). Die zweifach gespleißte *rev*-mRNA wird über den zellulären TAP vermittelten mRNA Exportweg ins

Zytoplasma transportiert. Nach der Translation bindet Rev über sein nukleäres Importsignal (NLS), eine argininreiche Domäne, direkt an den Importrezeptor Importin β (Palmeri and Malim, 1999; Stauber et al., 1998). Dies stellt insofern eine Besonderheit dar, als dass die meisten Proteine mit basischem NLS über ein Adaptorprotein, eines der Importin α -Proteine, mit Importin β interagieren. Der dimere Rev/Importin β Komplex gelangt durch Interaktion von Importin β mit Proteinen der Nukleopore in den Kern. Im Kern bindet Importin β an RanGTP und der Rev/Importin β Komplex zerfällt. Rev bindet zunächst als Monomer an einen spezifischen Bereich auf der viralen RNA, das Rev responsive Element (RRE). Das RRE ist ein 351 Nukleotide umfassender Bereich von ausgeprägter Sekundärstruktur, der innerhalb der *env*-Sequenz lokalisiert ist. Nachdem Rev an diesen Bereich gebunden hat, bildet das Protein Multimere aus (Mann et al., 1994; Zemmell et al., 1996). Funktionsanalysen multimerisierungsdefizienter Rev-Mutanten ergaben, dass Multimerisierung essentiell für die Funktion von Rev ist (Madore et al., 1994; Malim and Cullen, 1991; Olsen et al., 1990; Thomas et al., 1998; Zapp et al., 1991).

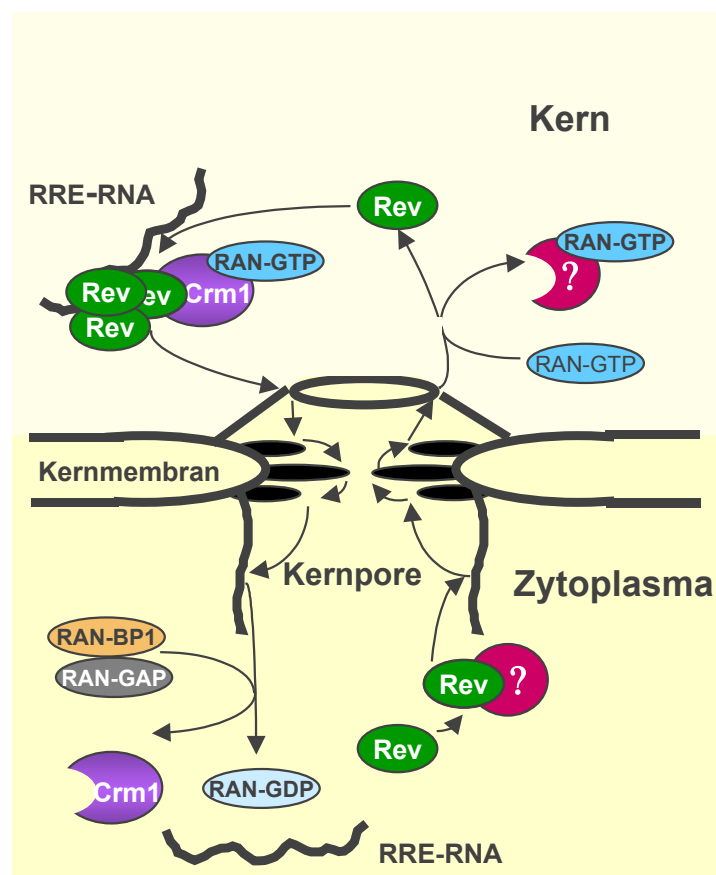


Abb. 1.7: Model zur Funktionsweise von Rev (nach (Cullen, 1998); Erklärung im Text)

In einem zweiten Schritt bindet Rev über sein nukleäres Exportsignal (NES), eine leucinreiche Domäne, an den Exportrezeptor Crm1 (Malim et al., 1991; Palmeri and Malim, 1996; Weichselbraun et al., 1992). Crm1 bindet nur in Gegenwart von RanGTP an sein Exportcargo. Der RNA-Protein Komplex, bestehend aus dem viralen RRE-Transkript, mehreren Rev-Molekülen, Crm1 und RanGTP, verlässt den Kern durch die Nukleopore. Dabei interagiert Crm1 mit Bestandteilen des Kernporenkomplexes. Im Zytoplasma vermittelt das Ran-GTPase aktivierende Protein (Ran-GAP) zusammen mit dem Ran-Bindeprotein 1 (RanBP1) die Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP und der Komplex zerfällt in seine Bestandteile. Rev kann nun erneut in den Kern transportiert werden. In Lokalisationsstudien zeigt Rev eine überwiegend nukleoläre Lokalisation.

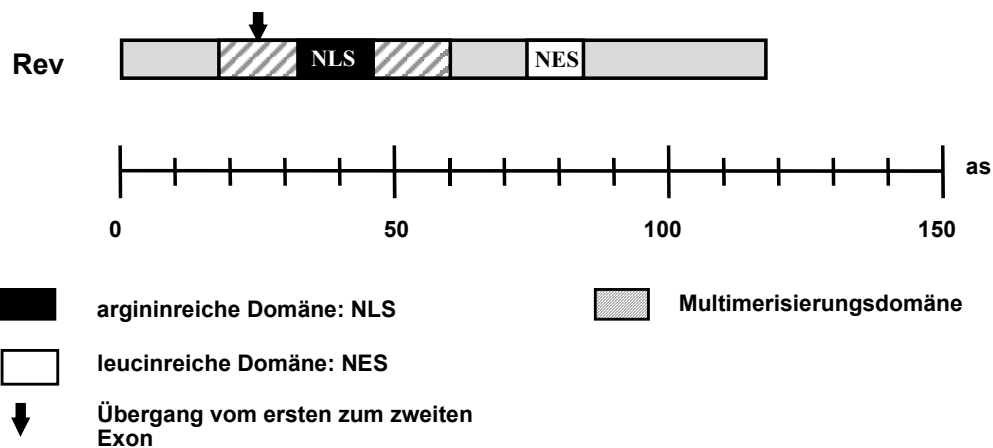


Abb. 1.8: Aufbau von Rev und Lokalisation funktionaler Domänen

In Abbildung 1.8 ist die Anordnung der funktionalen Domänen von Rev dargestellt. Das NLS besteht aus einer argininreichen Domäne, die sich im N-terminalen Bereich des Proteins befindet. Über diese Domäne erfolgt auch die Bindung von Rev an das RRE (Palmeri and Malim, 1999; Stauber et al., 1998). Die Multimerisierungsdomäne erstreckt sich von Aminosäure 18 bis 60 und schließt damit die argininreiche Domäne mit ein. Das NES, eine leucinreiche Domäne, befindet sich im C-terminalen Bereich des Proteins.

1.3.3.2 Rex/RxRE

Auch das humane T-Zell Leukämie Virus (HTLV) kodiert für ein posttranskriptionell regulatorisches Protein. Dieses wurde in Analogie zu dem HIV/Rev Protein Rex (**r**egulator of **e**xpression encoded by the **x** gene) genannt. Rex ist nicht nur in seiner Funktion homolog zu Rev, es zeigt auch strukturelle Ähnlichkeiten (Abb. 1.9).

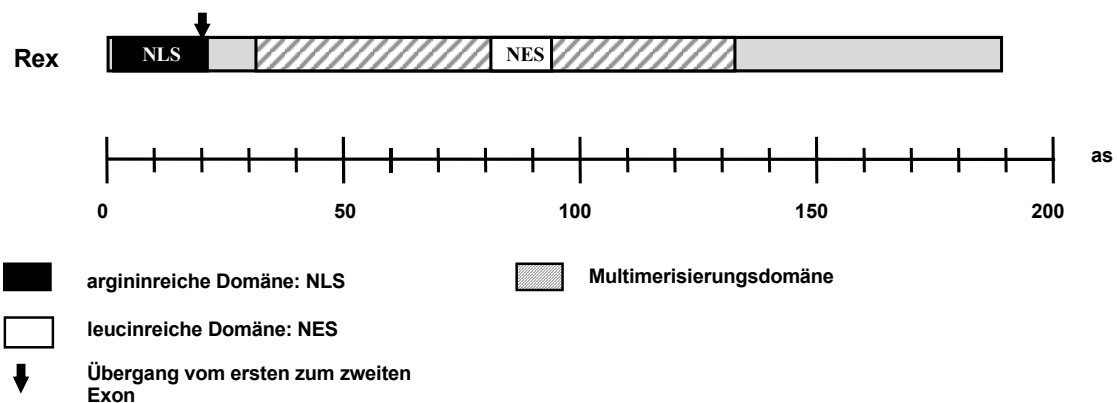


Abb. 1.9: Aufbau von Rex und Anordnung der funktionalen Domänen

Genau wie HIV/Rev besitzt auch Rex eine multifunktionelle argininreiche Domäne, die sowohl als NLS als auch als RNA-Bindedomäne fungiert. Auch bei Rex erfolgt der nukleäre Import nur über Importin β . Wie aus Abbildung 1.9 hervorgeht, befindet sich die argininreiche Domäne ebenfalls im N-terminalen Bereich des Proteins. Bei HTLV erfolgt die Bindung an die viralen ungespleißten und unvollständig gespleißten Transkripte über das RxRE (**R**ex **r**esponsive **E**lement), das sich im 3' U3R-Bereich von HTLV befindet (Ahmed et al., 1990). Auch Rex verfügt über eine Multimerisierungsdomäne, die sich von Aminosäure 32 bis 133 erstreckt und damit das NES mit einschliesst. Das NES besteht ebenfalls aus einer leucinreichen Domäne, die mit dem Exportrezeptor Crm1 interagiert. In Lokalisationsstudien zeigt Rex eine überwiegend nukleoläre Lokalisation, wobei Rex in Form von „Tupfen“ in den Nukleoli sichtbar ist.

1.3.3.3 Rec/RcRE

Durch das Vorhandensein von mehrfach gespleißten viralen Transkripten und der Existenz des regulatorischen Proteins Rec ist HERV-K den komplexen Retroviren zuzuordnen. Genau wie Rev und Rex vermittelt Rec durch Bindung an sein responsives Element den nukleo-zytoplasmatischen Export der viralen Vollängen- und subgenomischen *env*-Transkripte (Magin, 1997). Das **Rec responsive Element (RcRE)** umfasst einen Bereich von 430 Nukleotiden und befindet sich im Bereich der U3-Region der 3' LTR. Durch *in vivo* Funktionsanalysen und *in vitro* Protein-RNA-Bindungsstudien, letztere wurden im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt, konnte gezeigt werden, dass Rec im Gegensatz zu Rev nicht an ein sequenzspezifisches Motiv auf der RNA bindet, sondern dass für die Bindung von Rec an das RcRE eine komplexe, gefaltete RNA-Struktur erforderlich ist. Dabei erfolgt die Bindung von Rec an das RcRE wahrscheinlich über mehrere Kontaktpunkte, die innerhalb der verschiedenen „Stem-Loop“-Strukturen lokalisiert sind (Magin-Lachmann et al., 2001). Rec ist nicht nur in seiner Funktion homolog zu Rev und Rex, es zeigt auch sehr starke strukturelle Ähnlichkeiten zu beiden Proteinen, vor allem zu HTLV/Rex (Abb. 1.10). In Lokalisationsstudien zeigt Rec eine überwiegend nukleoläre Lokalisation.

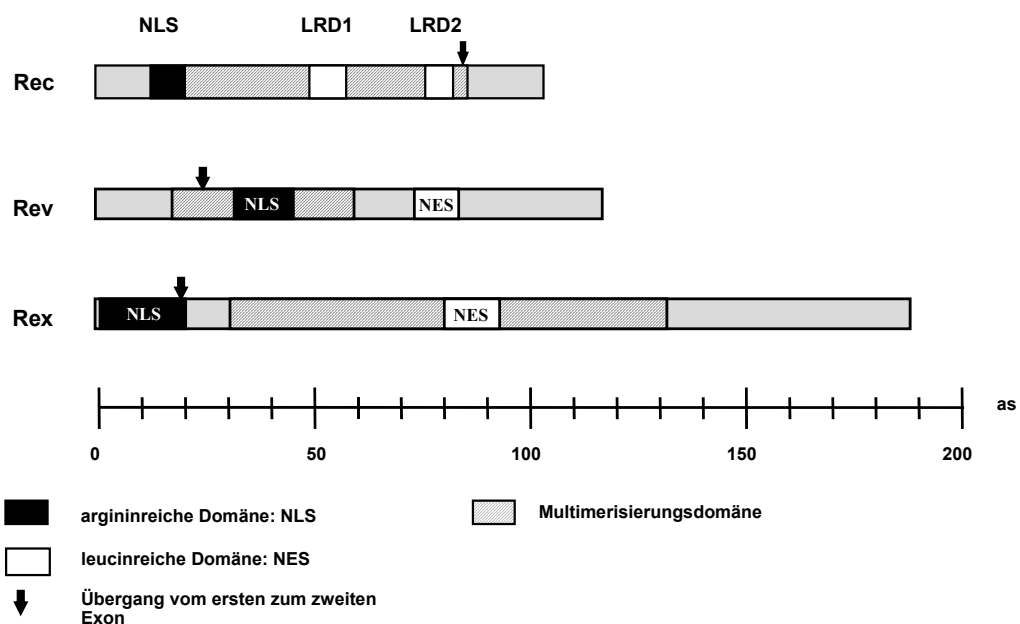


Abb. 1.10: Aufbau von Rec, Rev und Rex und Anordnung der funktionalen Domänen. LRD: leucinreiche Domäne

HIV-1 Rev	L	P	P	·	L	E	R	·	L	T	L
HTLV1 Rex	L	S	A	Q	L	Y	S	S	L	S	L
HERV-K LRD1	W	A	Q	·	L	K	K	·	L	T	Q L
HERV-K LRD2	E	S	M	L	L	A	A	·	L	M	I
Konsensussequenz	L	X₂₋₃			L	X₂₋₃			L X	L/I	

Abb. 1.11: Vergleich der leucinreichen Domänen von Rec mit den nukleären Exportsignalen von Rev und Rex

Analog zu Rev und Rex erstreckt sich im N-terminalen Bereich des Proteins von Aminosäure 13-20 eine argininreiche Domäne. Durch Funktionsanalysen und Lokalisationsstudien konnte gezeigt werden, dass es sich bei dieser Domäne um das nukleäre Importsignal (NLS) handelt (Magin et al., 2000). Auch bei Rec ist diese Domäne für die Bindung an die viralen Transkripte von Bedeutung. Rec verfügt ebenfalls über eine putative Multimerisierungsdomäne, ein „Helix-Loop-Helix“ Motiv (Löwer et al., 1995). Wie bei Rex wäre diese Domäne stromabwärts vom NLS lokalisiert und würde mit der ersten leucinreichen Domäne (LRD) überlappen. Bei den regulatorischen Proteinen Rev und Rex ist schon gezeigt worden, dass Multimerisierung entscheidend für die biologische Aktivität der Proteine ist. Auch bei Rec führten Mutationen im Bereich der putativen Multimerisierungsdomäne zu einem starken Aktivitätsverlust des Proteins (unveröffentlichte Daten). Im Unterschied zu Rev und Rex besitzt Rec zwei leucinreiche Domänen. Die erste Domäne erstreckt sich von Aminosäure 50-59. Die zweite leucinreiche Domäne ist im C-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert und erstreckt sich von Aminosäure 77-83 (Abb. 1.10). Beide Domänen zeigen strukturelle Ähnlichkeiten zu den Exportsignalen von Rev und Rex (Abb. 1.11). Bei Rev und Rex bildet die leucinreiche Domäne das nukleäre Exportsignal (NES), das von dem zellulären Exportrezeptor Crm1 erkannt wird. Für Rec ist bereits gezeigt worden, dass durch Zugabe von Leptomycin B, eines Crm1 spezifischen Inhibitors, der Rec vermittelte virale RNA Export blockiert werden kann (Magin et al., 2000). Dies deutet daraufhin, dass auch bei HERV-K der Export der viralen ungespleißten oder unvollständig gespleißten Transkripte über Crm1 erfolgt. Jedoch ist nicht bewiesen, dass Leptomycin B ausschließlich Crm1 blockiert. Es ist auch denkbar, dass Leptomycin B eine inhibierende Wirkung auf andere, Crm1 verwandte

Exportrezeptoren ausübt. Ebenfalls unklar ist, wie das nukleäre Exportsignal von Rec aussieht.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Das posttranskriptional regulatorische Protein Rec zeigt funktionelle und strukturelle Ähnlichkeiten zu den regulatorischen Proteinen HIV/Rev und HTLV/Rex. Alle drei Proteine vermitteln den nukleären Export von ungespleißter und unvollständig gespleißter viraler RNA. Bei Rev und Rex ist die Funktionsweise schon weitgehend aufgeklärt. Beide Proteine binden im Kern als Multimer an spezifische Bereiche auf der viralen RNA, die responsiven Elemente. In einem zweiten Schritt interagieren sie mit dem zellulären Exportrezeptor Crm1, der den Transport des RNA-Protein-Komplexes ins Zytoplasma vermittelt. Auch die funktionalen Domänen, die für die RNA-Bindung, Multimerisierung und Exportrezeptor-Bindung verantwortlich sind, konnten bereits charakterisiert werden. Bei Rec sind die funktionalen Exportdomänen sowie der zelluläre Exportrezeptor noch weitgehend unerforscht.

In dieser Arbeit soll daher untersucht werden, ob der Rec-vermittelte RNA-Export wie bei Rev und Rex über den Exportrezeptor Crm1 erfolgt. Es gibt bereits Hinweise, die auf eine Beteiligung von Crm1 am Rec vermittelten RNA-Export hindeuten. Nach der Identifikation des Exportrezeptors soll das nukleäre Exportsignal von Rec identifiziert werden. Für Crm1 ist bekannt, dass das Protein häufig über leucinreiche Domänen an sein Exportcargo bindet. Rec besitzt zwei leucinreiche Domänen. Es sollen beide leucinreichen Domänen hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Exportrezeptorbindung, sowie Multimerisierung und RcRE-Bindung untersucht werden.

Ferner wurde zur Charakterisierung des RcRE beigetragen. Diese Daten sind bereits veröffentlicht und sollen kurz zusammengefasst werden.

2 Ergebnisse

2.1 Charakterisierung des RcRE *in vitro*

Ähnlich wie bei HIV und HTLV erfolgt auch bei HERV-K die Bindung von Rec an die viralen Transkripte über eine charakteristische Domäne auf der viralen RNA, das Rec responsive Element (RcRE). Das RcRE setzt sich aus 429 Nukleotiden zusammen und befindet sich in der U3-Region der 3' LTR. Dieses Element wurde von unserer Arbeitsgruppe näher charakterisiert. Da die Ergebnisse dieser Analyse bereits publiziert sind (Magin-Lachmann et al., 2001) werden sie hier nur kurz zusammengefasst. Mein Beitrag zu dieser Publikation war die Untersuchung der Bindung von Rec an die getesteten RcRE-Sequenzen.

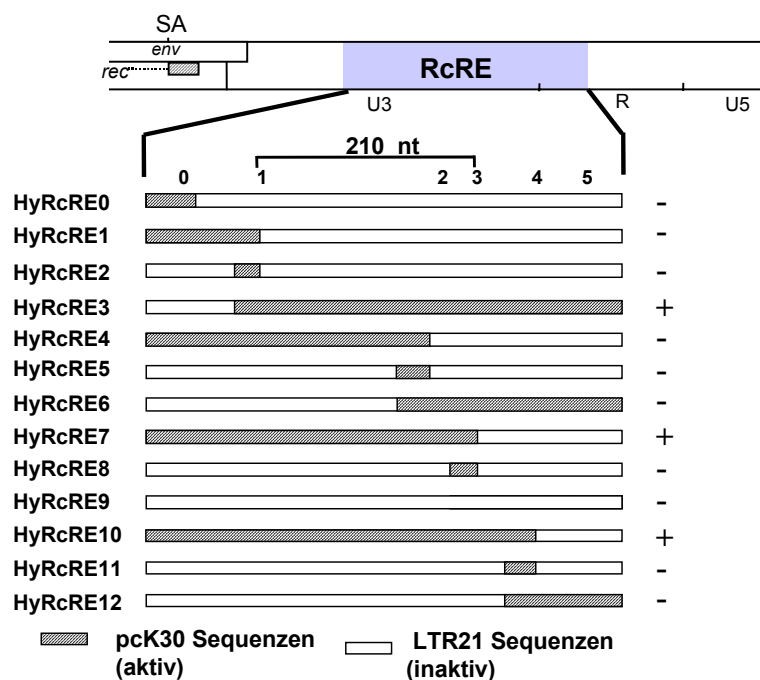


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Hybridsequenzen. Die pcK30 Sequenzen sind als schraffierte Boxen dargestellt und die LTR21 Sequenzen als weiße Boxen. 0 bis 5: Cluster von Punktmutationen, -: inaktive, +: aktiv

Bereits zuvor durchgeführte Untersuchungen verschiedener HERV-K LTRs hatten ergeben, dass nicht alle LTRs Exportaktivität haben. Sequenzvergleiche zwischen aktiven und inaktiven HERV-K LTRs zeigten spezifische Anhäufungen von Punktmutationen im

RcRE. Deshalb stellte sich die Frage, ob Mutationen, die sich im Bereich des RcRE befinden, einen Funktionsverlust zur Folge haben. Die Analyse von RcRE-Hybrid Konstrukten, in denen Sequenzen von aktiven und inaktiven LTRs kombiniert wurden (Abb. 2.1) ergab, dass die Anhäufungen von Punktmutationen in einem mehr als 210 Nukleotide umfassenden Sequenzbereich zum Funktionsverlust führen.

Das Ergebnis, dass die minimale Rec-Bindedomäne einen so großen Sequenzbereich umfasst, war überraschend, da für Rev und Rex bekannt ist, dass die Bindung an die RNA letztlich über ein Sequenzmotiv erfolgt, das lediglich aus 20-30 Nukleotiden besteht. Da es eher unwahrscheinlich ist, dass es sich bei einem Bereich von 210 Nukleotiden um ein sequenzspezifisches Bindungsmotiv handelt, wurde als nächstes die zweidimensionale Struktur des RcREs computergestützt untersucht. Die Strukturanalyse erfolgte mittels des DNASIS RNA Faltungsprogramms von Hitachi, das unter Berücksichtigung des energetisch günstigsten Zustandes eine Vorhersage über die Sekundärstruktur trifft. Die Analyse ergab die in Abbildung 2.2 dargestellte putative Sekundärstruktur.

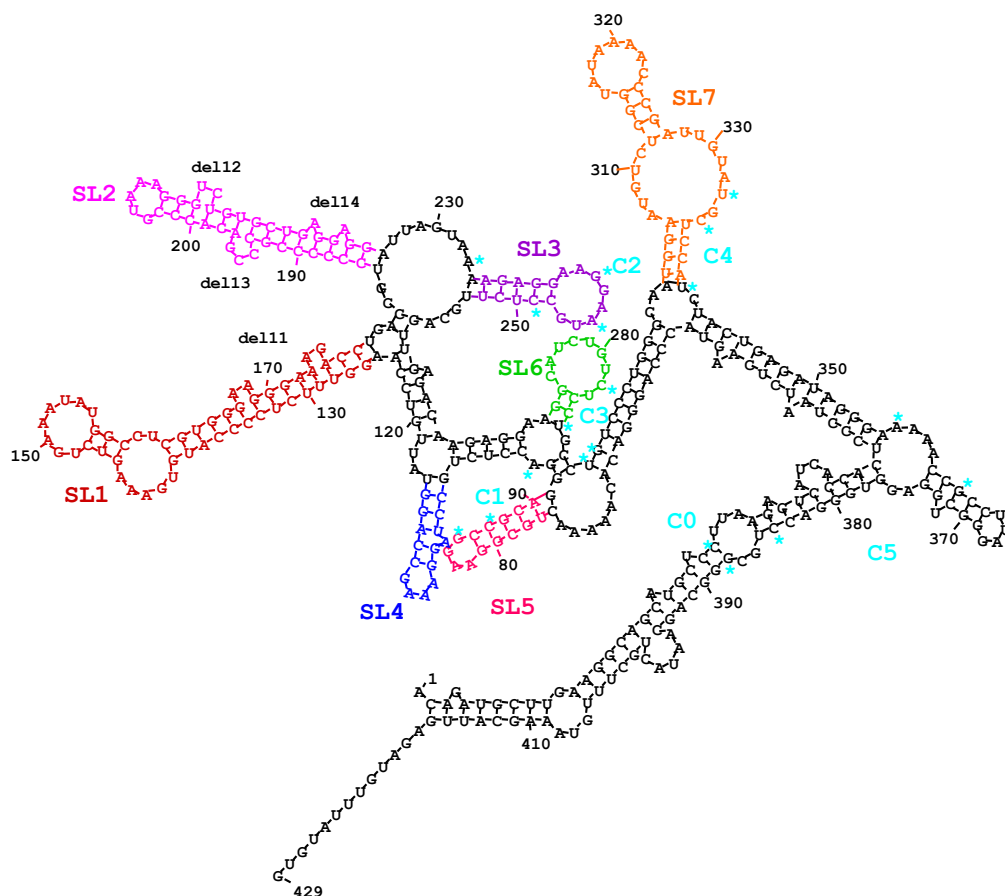


Abb. 2.2: Computergenerierte Sekundärstruktur des aktiven pcK30 RcRE. Die Struktur wurde unter Verwendung des DNASIS RNA Faltungsprogramms von Hitachi vorhergesagt.

Demnach ist das HERV-K RcRE eine komplexe, gefaltete Struktur, die sich aus zahlreichen „Stem-Loops“ zusammensetzt. Interessanterweise zeigte die computergestützte Vorhersage auch, dass sich die zweidimensionale Struktur des aktiven RcRE pcK30 deutlich von der des inaktiven LTR21 RcREs unterscheidet (Daten nicht gezeigt). Nur die aktiven Hybride besitzen eine Konformation, die mit der des pcK30 RcREs übereinstimmt. Die Ausbildung der „Stem-Loops“ eins bis sieben scheint dabei von entscheidender Bedeutung zu sein.

Um die Bedeutung der einzelnen „Stem-Loops“ für die Bindung von Rec zu untersuchen, wurden weitere RcRE Mutanten kloniert. Dabei wurden Konstrukte hergestellt, bei denen jeweils ein einzelner „Stem-Loop“ (Abb. 2.2, Del 1-7) deletiert wurde, ohne die übrige Struktur des RcREs zu beeinflussen. Zusätzlich zu diesen großen Deletionen wurden noch kleinere Bereiche (Abb. 2.2, Del 11-14) in „Stem-Loop“ 1 und 2 deletiert. Die Sekundärstruktur der einzelnen Deletionsmutanten wurde mit dem DNASIS RNA Faltungsprogramm überprüft. Die Aktivität der verschiedenen Deletionsmutanten wurde mittels eines *in vivo* Funktionsassays überprüft. Dabei zeigte sich, dass nicht nur die Deletion eines einzigen „Stem-Loops“ zum Funktionsverlust von Rec führt, sondern dass die Deletion von drei weiteren „Stem-Loops“ ebenfalls die Aktivität von Rec drastisch vermindert. Dieses Ergebnis bekräftigt die Hypothese, dass Rec nicht über ein sequenzspezifisches Motiv an das RcRE bindet. Mit dem verwendeten Testsystem konnte jedoch nicht bewiesen werden, dass der Funktionsverlust auf den Verlust der Bindung von Rec an das RcRE zurückzuführen ist. Deshalb wurde über *in vitro* Protein-RNA-Bindungsstudien untersucht, an welche der mutierten RcRE RNA Sequenzen Rec binden kann. Für diese Untersuchungen wurden rekombinantes gereinigtes Rec Protein und *in vitro* transkribierte RcRE-RNA verwendet. Aus Abbildung 2.3 geht hervor, dass Rec spezifisch an die biologisch aktive pcK30 RcRE RNA bindet, aber nicht an die biologisch inaktive LTR21 RcRE RNA. Das Rec-Bindevermögen der verschiedenen Hybrid- und Deletions-RcRE RNAs wurde mit einem Kompetitionsexperiment bestimmt. Dazu wurde untersucht, inwieweit die nicht radioaktiv markierten Hybrid- und Deletions-RcRE RNAs mit der ³²P-markierten pcK30 RcRE RNA um die Bindung von Rec konkurrieren können. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.3 und Tabelle 2.1 zusammengefasst. Nur die biologisch aktiven Hybrid-RcRE Transkripte HyRcRE3, HyRcRE7 und HyRcRE10 konnten mit der radioaktiv markierten Sonde um die Bindung von Rec konkurrieren. Damit haben die *in vitro* Ergebnisse die *in vivo* Ergebnisse bestätigen können. Die gemessene biologische Aktivität der Hybrid-RcRE RNAs war das

Ergebnis der direkten Bindung von Rec an diese Hybrid-Sequenzen. Überraschenderweise ergab die Untersuchung der Deletionsmutanten, dass durch die Deletion eines einzelnen „Stem-Loops“ die Rec-Bindung nicht verloren geht. *In vivo* konnte jedoch gezeigt werden, dass die Deletion eines einzelnen „Stem-Loops“ (**SL2**, **SL4**, **SL5** oder **SL6**) bereits zum Funktionsverlust von Rec führen kann. Dieses Ergebnis legt nahe, dass zum Aufbau eines aktiven Exportkomplexes mehr als ein Kontaktpunkt zwischen Rec-Protein und RcRE nötig ist oder mehrere Rec-Moleküle an das RcRE binden.

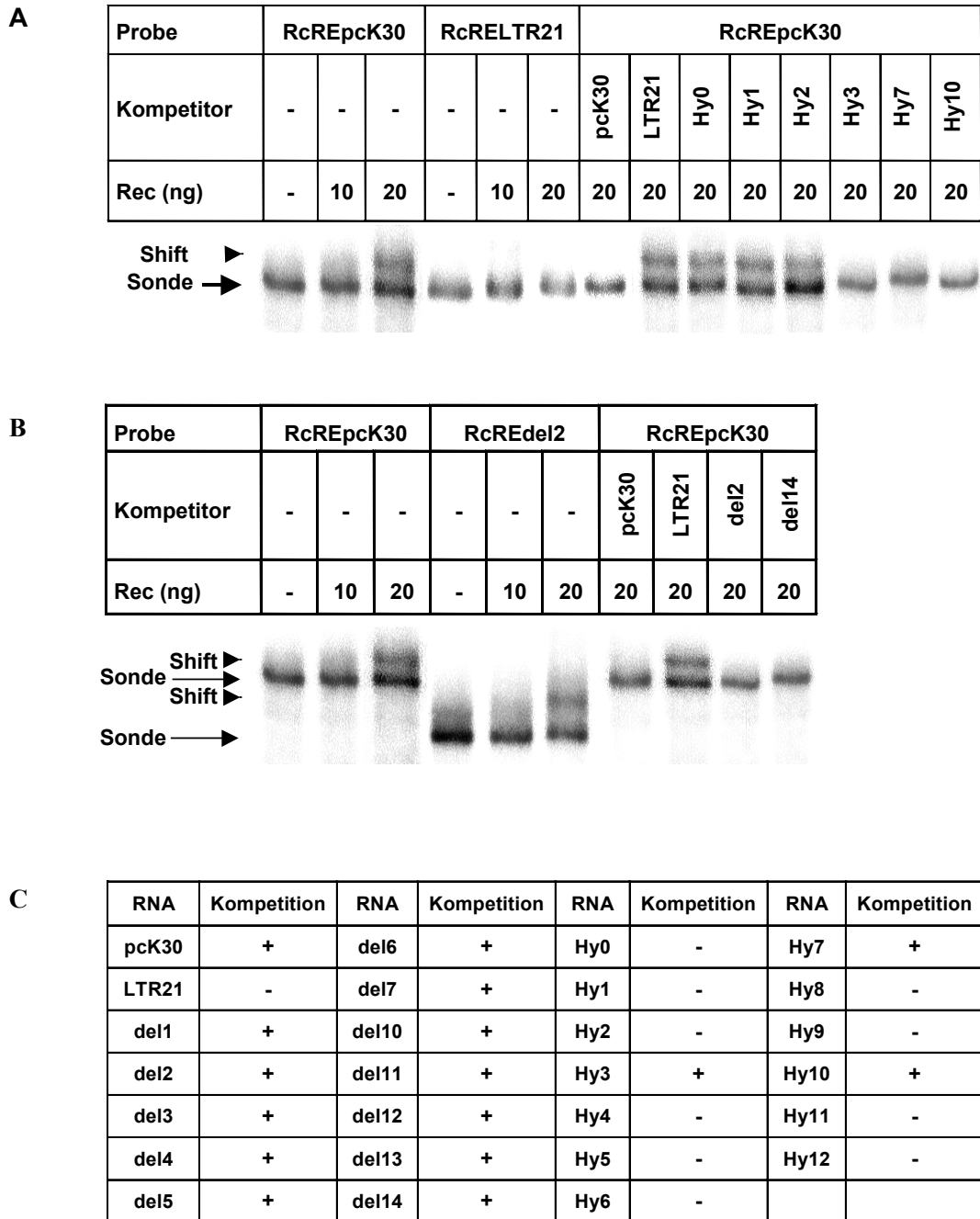


Abb. 2.3: Bindung von rekombinanten gereinigten Rec Protein an die verschiedenen *in vitro* transkribierten RcRE RNAs. Für die Konkurrenzexperimente wurden 40000 cpm ^{32}P markierter pcK30 RcRE RNA als Sonde eingesetzt.

A) Titration von Rec auf dem aktiven und inaktiven RcRE sowie Konkurrenz der Bindung von Rec an die Sonde mit den verschiedenen Hybridsequenzen.

B) Titration von Rec auf der pcK30RcRE und der RcREdel2 RNA sowie Konkurrenz der Bindung von Rec an die Sonde mit den verschiedenen Deletionssequenzen.

C) Tabellarische Zusammenfassung der Konkurrenzergebnisse.

2.2 Crm1 ist der nukleäre Exportrezeptor von Rec

2.2.1 Der Rec vermittelte RNA Export kann durch „Pendel“-Proteine, die das NES von Rev oder Rex tragen blockiert werden

Für den Export der viralen Transkripte benötigt Rec einen zellulären Exportrezeptor, der den Transport des RNA/Rec-Komplexes durch die Nukleopore ins Zytoplasma vermittelt. Bei Rev und Rex konnte Crm1, ein Mitglied der Importin β Familie, als zellulärer Exportrezeptor identifiziert werden. Crm1 bindet über leucinreiche Exportsignale an seine Zielproteine. Aufgrund der funktionalen Ähnlichkeit von Rec zu Rev und Rex und des Vorhandenseins von zwei leucinreichen Domänen (AS 50-59 und AS 77-83) wurde auch für Rec Crm1 als Exportrezeptor vermutet. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde ein Experiment durchgeführt, das auf folgender Überlegung basiert: wenn alle drei Proteine- Rec, Rev und Rex- Crm1 als Exportrezeptor benutzen, dann müsste in Gegenwart von Rev und Rex der Rec-abhängige RNA Export durch Konkurrenz um Crm1 blockiert werden. Für dieses Konkurrenzexperiment wurde ein Testsystem verwendet, das in der Arbeitsgruppe für Funktionsstudien von Rec entwickelt wurde. Dieses Testsystem umfasst drei Komponenten: 1. ein Reporterplasmid, das neben dem HIV *gag*-Gen, dessen Genexpression von einem HIV Promotor gesteuert wird, das HERV-K RcRE enthält. 2. ein Plasmid, das Rec exprimiert, z.B. pRec und 3. HL-tat-Zellen (stabil mit HIV-*tat* transfizierte HL-Zellen; Tat transaktiviert den HIV Promotor von pHIVgagRcRE (Schwartz et al., 1990)). Der Export der HIV-*gag* Transkripte aus dem Kern ins Zytoplasma erfolgt nur, wenn Rec an sein RcRE binden und einen aktiven Exportkomplex bilden kann (Abb. 2.5). Die Gag Expression im Zytoplasma wird mittels eines HIV p24 ELISA quantifiziert.

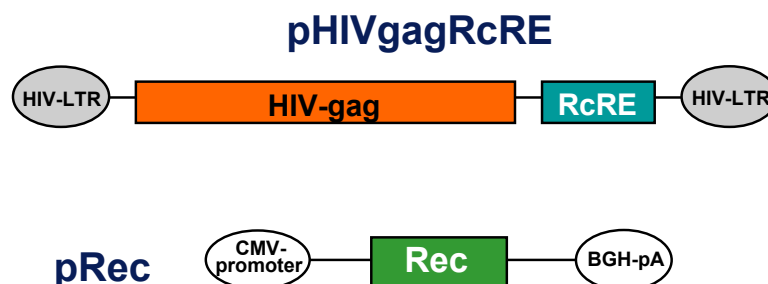


Abb. 2.4: Schematische Darstellung des HIVgag Reporterplasmids und des pRec-Effektorplasmids

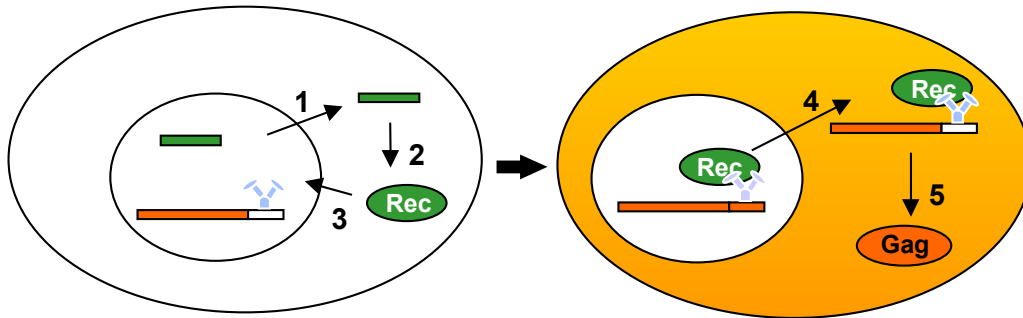


Abb. 2.5: Funktionsweise des HIV Testsystems

1. Die *rec*-mRNA gelangt über den normalen mRNA Exportweg ins Zytoplasma
2. Im Zytoplasma wird Rec translatiert.
3. Rec wird über sein Importsignal in den Kern transportiert.
4. Im Kern bindet Rec an sein RcRE, das gag Transkript wird im Komplex mit Rec und einem Exportrezeptor ins Zytoplasma transportiert.
5. Im Zytoplasma wird Gag gebildet.

Die Gag Expression kann in der Immunfluoreszenz oder im HIV p24 ELISA überprüft werden.

Für die Konkurrenz um Crm1-Bindung wurden zusätzlich zu den genannten Vektoren noch Expressionsplasmide konstruiert, die das NES von Rev und Rex tragen. In vorherigen Untersuchungen zeigte sich, dass sowohl Rev als auch Rex an das HERV-K RcRE binden können (Magin-Lachmann et al., 2001). Um eine Bindung von Rev oder Rex an das RcRE auf dem Reportertranskript zu verhindern, wurden die Rev und Rex Sequenzen stromabwärts vom nukleären Importsignal (NLS), das bei Rev und Rex auch die RNA-Bindedomäne beinhaltet, in den Expressionsvektor pCFN kloniert. Die Vektoren pCFN und pCFNrex wurden uns freundlicherweise von Prof. Döbelstein (Phillips-Universität, Marburg) zur Verfügung gestellt (Roth and Döbelstein, 1997). Dieser hat ein potentes NLS, das nicht von einem retroviralem RNA Exportadaptor stammt (Abb. 2.6). Die Vektoren pCFNrex und pCFNrev enthalten das Importsignal von SV40 und das Exportsignal von Rev oder Rex. Die exprimierten Proteine CFNrev und CFNrex können zwischen Kern und Zytoplasma pendeln und an den Exportrezeptor Crm1 binden, sie können jedoch nicht an das Reportertranskript pHIVgagRcRE binden.

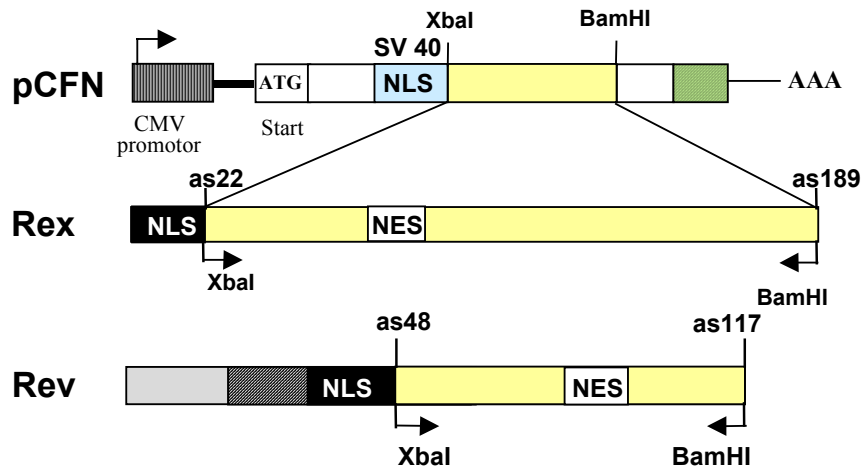


Abb. 2.6: Schematische Darstellung der Konstrukte pCFNrev und pCFNrex

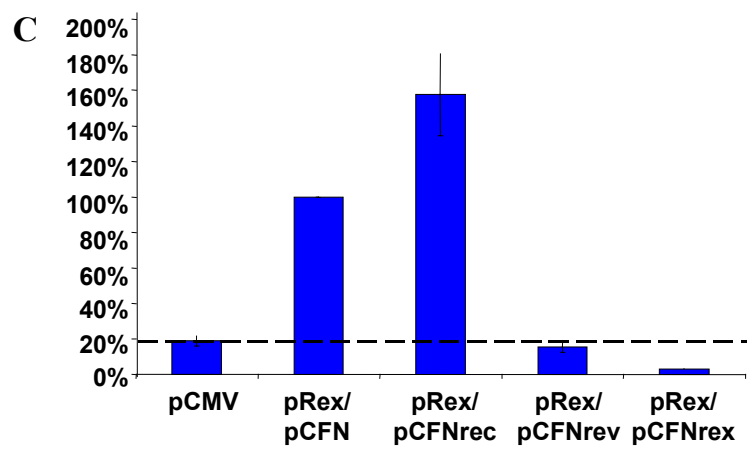
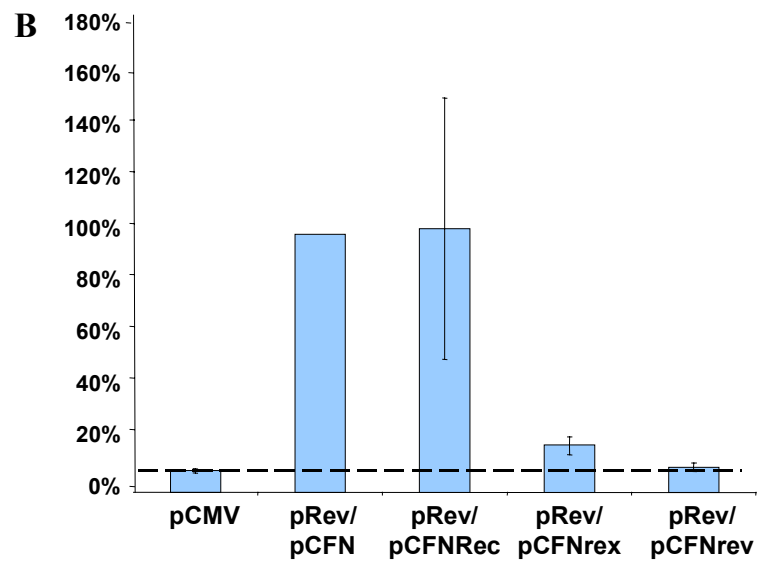
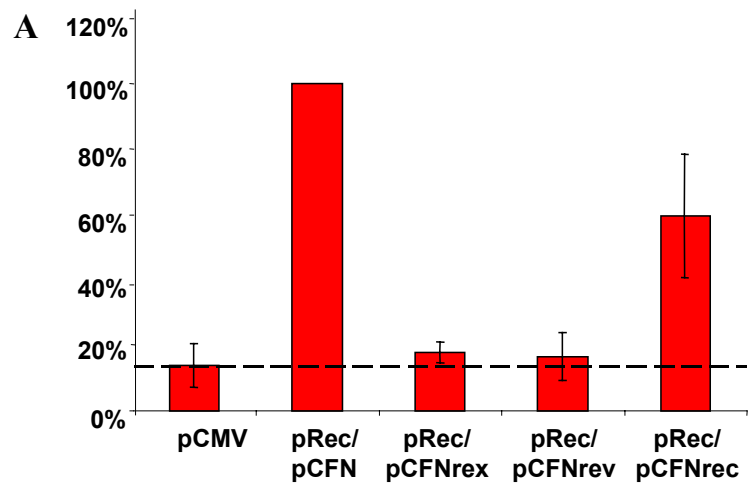
Die Rev bzw. Rex-Sequenzen stromabwärts vom NLS wurden in den Vektor pCFN kloniert. Die exprimierten Proteine CFNrev und CFNrex tragen das NLS von SV40 und das NES von Rev bzw. Rex. Sie besitzen jedoch keine RNA-Bindedomäne.

Die Plasmide pHIVgagRcRE und pRec wurden jeweils mit den Vektoren pCFN, pCFNrev und pCFNrex kotransfiziert. Dabei wurden die Vektoren pCFN, pCFNrev und pCFNrex im dreifachen molarem Überschuss gegenüber pRec eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde das Reporterplasmid pHIVgagRcRE mit dem Vektor pCMV kotransfiziert, der weder NLS noch NES besitzt.

Die Experimente wurden dreifach, jeweils in Triplikaten durchgeführt. Die Quantifizierung der HIV Gag Expression erfolgte mittels eines HIV p24 ELISAs der Firma Abbott. Die Menge an p24, die bei Kotransfektion von pHIVgagRcRE und pRec mit pCFN gemessen wurde, wurde als 100 % gesetzt (Abb. 2.7). Auf diese Weise wurde der Einfluss des SV40 NLS berücksichtigt, das möglicherweise mit dem NLS von Rec um Importfaktoren konkurrieren könnte. Wie aus Abbildung 2.7 hervorgeht, kann sowohl mit pCFNrex als auch mit pCFNrev der Rec-vermittelte RNA-Export komplett blockiert werden. Zu dieser Blockierung kann es nur kommen, wenn Rec mit Rev oder Rex um Komponenten des Exportkomplexes kompetitiert. Lässt sich der Rec-abhängige RNA-Export durch Wegfangen des Exportrezeptors Crm1 mit Rev und Rex blockieren, so müsste man auch umgekehrt den Rev- und Rex-abhängigen RNA-Export mit Rec blockieren können. Für diese Untersuchungen wurde zusätzlich das Expressionsplasmid pCFNrec konstruiert, bei dem, analog zu den Konstrukten pCFNrev und pCFNrex, die Rec-Sequenz stromabwärts vom NLS in den Vektor pCFN kloniert wurde. Für das Wettbewerbsexperiment wurden entweder die Vektoren pHIVgagRRE und pRev oder pHIVgagRxRE und pRex mit den

Vektoren pCFN oder pCFNrec in HL-tat Zellen kotransfiziert. Die Reporterplasmide tragen bei diesen Versuchsansätzen das responsive Element von Rev (RRE) oder Rex (RxRE). Zusätzlich wurde noch untersucht, ob sich der Rev-abhängige RNA-Export mit CFNrex bzw. der Rex-abhängige RNA-Export mit CFNrev blockieren lässt. Wie aus Abbildung 2.7 B und C hervorgeht, konnte entgegen den Erwartungen weder der Rev-abhängige noch der Rex-abhängige RNA-Export durch CFNrec blockiert werden. Jedoch lässt sich auch der Rec-abhängige RNA-Export in Gegenwart von CFNrec nur um 40% reduzieren (Abb. 2.7 A). Dies deutet darauf hin, dass CFNrec nicht oder nur wenig effizient an den Exportrezeptor binden kann. Bereits in früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass N-terminale Fusionsanteile zum Funktionsverlust von Rec führen. Die Verminderung der RNA Exportaktivität von Rec um 30% ist wahrscheinlich auf die Ausbildung von inaktiven Heteromultimeren zwischen Rec und CFNrec zurückzuführen. Mit Hilfe eines *in vivo* Multimerisierungsassays, der unter 2.3.8 im Detail beschrieben ist, konnten wir zeigen, dass CFNrec multimerisieren kann. Die Untersuchungen zeigen aber auch, dass im Gegensatz zu Rec-wt CFNrec vermehrt im Kern lokalisiert ist, was darauf hindeutet, dass es sich bei CFNrec tatsächlich um eine Exportmutante handelt (Abb. 2.7 D). Der Rev-abhängige RNA-Export kann in Gegenwart von CFNrex und der Rex-abhängige RNA-Export in Gegenwart von CFNrev vollständig blockiert werden (Abb. 2.7 B, C).

Zusammenfassend haben die Untersuchungen gezeigt, dass Rev, Rex und Rec einen ähnlichen Exportweg benutzen.



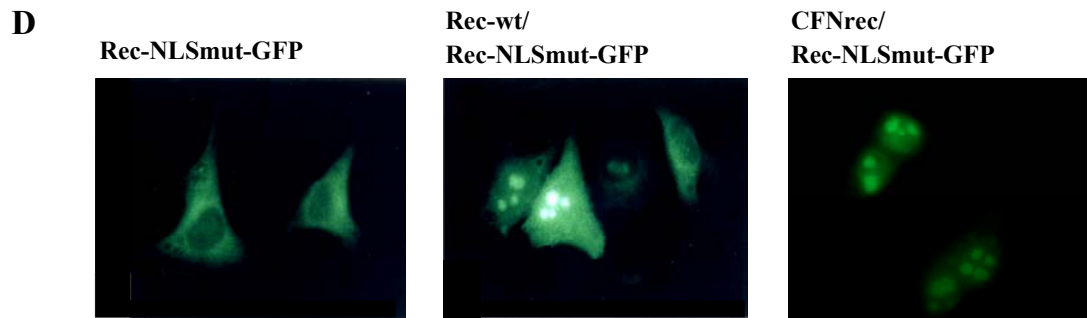


Abb. 2.7: Quantifizierung des HIV Gag Proteins mit Hilfe des HIV Antigen Tests (Abbott).

A) HI-Zellen kotransfiziert mit pHIVgagRcRE, pRec und entweder mit pCFN, pCFNrev oder pCFNrex.

B) HI-Zellen kotransfiziert mit pHIVgagRxRE, pRex und entweder mit pCFN, pCFNrec oder pCFNrev

C) HI-Zellen kotransfiziert mit pHIVgagRRE, pRev und entweder mit pCFN, pCFNrec oder pCFNrex. ---: cut off

D) Überprüfung der Multimerisierung von CFNrec. Die Importmutante Rec-NLSmut-GFP zeigt eine zytoplasmatische Lokalisation. Nach Kotransfektion von Rec-NLSmut-GFP mit CFNrec kann Rec-NLSmut-GFP in den Nukleoli und im Zellkern nachgewiesen werden, genauso wie nach Kotransfektion mit Rec-wt. Die veränderte Lokalisation ist auf die Ausbildung von Dimeren zwischen CFNrec und Rec-NLSmut-GFP zurückzuführen.

2.2.2 Crm1 bindet an Rec in Gegenwart von RanGTP

Die bisherigen Versuche konnten nur indirekt eine Beteiligung von Crm1 am Rec-vermittelten RNA-Export zeigen. Im Folgenden wurde mittels Ko-Immunpräzipitation überprüft, ob eine direkte Interaktion zwischen Rec und Crm1 vorliegt. Da in HL-Zellen Rec nicht endogen exprimiert wird, wurden HL-Zellen transient mit dem Expressionsplasmid pRec transfiziert. Crm1 ist ein zelluläres Protein, das in HL-Zellen exprimiert wird. Proteine, die im Komplex mit Rec vorlagen, wurden mittels eines α -Rec Antikörpers, der an Protein G-Sepharose gekoppelt wurde, präzipitiert. Die gebundenen und ungebundenen Fraktionen wurden anschließend im Western Blot analysiert (Abb. 2.8). Der Nachweis von Crm1 erfolgte über einen polyklonalen α -Crm1 Antikörper, der uns freundlicherweise von Prof. Görlich (Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurde (Paraskeva et al., 1999). Aus zahlreichen Publikationen ist bekannt, dass sich Crm1 nur in Gegenwart von RanGTP präzipitieren lässt (Fornerod, 1997). Um eine ausreichende Menge an RanGTP im Versuchsansatz zu gewährleisten, haben wir rekombinantes gereinigtes RanQ69L zu dem Versuchsansatz zugegeben. RanQ69L ist eine GTPase defiziente Mutante, die nach Beladung mit GTP permanent im GTP gebundenen Zustand vorliegt (Kutay et al., 1997).

Das RanQ69L Expressionsplasmid wurde uns von Prof. Görlich (Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Das Protein wurde rekombinant in *E.coli* exprimiert und anschließend über Kationenaustausch-Chromatographie aufgereinigt. Die Reinheit des Proteins wurde im Coomassie gefärbten Gel überprüft. Wie aus Abbildung 2.8 B hervorgeht, konnte mit Hilfe der Kationenaustausch-Chromatographie eine Protein-Reinheit von über 90% erzielt werden.

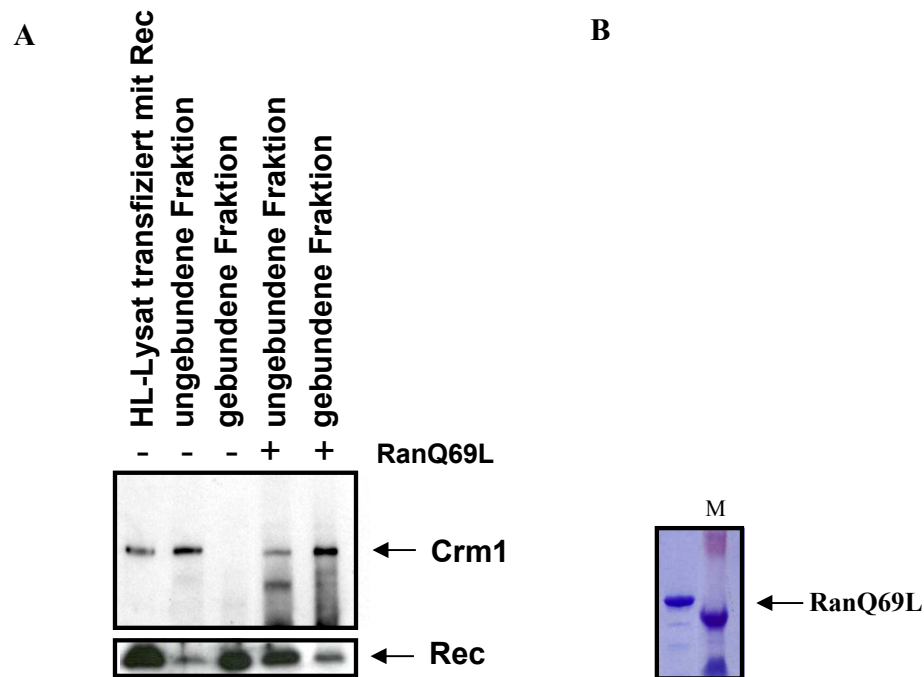


Abb. 2.8: A) Überprüfung der Crm1-Bindung im Western Blot. Nach der Immunpräzipitation wurden die gebundenen und ungebundenen Fraktionen im Western Blot analysiert. Der Nachweis von Crm1 erfolgte mit einem polyklonalen α -Crm1 Antikörper. Der Nachweis von Rec erfolgte mit einem Kaninchen α -Rec Antikörper. Die Immunpräzipitation wurde mit einem α -Rec Antikörper durchgeführt.

B) Überprüfung der Reinheit von rekombinantem RanQ69L im Coomassie gefärbten Gel. M: Marker

Wie aus Abbildung 2.8 hervorgeht, kann in mit Rec transfizierten HL-Lysaten in Abwesenheit von RanQ69L Crm1 nur in der ungebundenen Fraktion nachgewiesen werden. In Gegenwart von RanQ69L kann Crm1 über die Bindung an Rec ko-immunpräzipitiert werden. Als Kontrolle, dass Crm1 nicht durch Bindung von RanQ69L an die Protein G-Sepharose präzipitiert wurde, wurde in einem weiteren Ansatz HL-Zellysat mit Protein G-Sepharose und RanQ69L inkubiert. Bei der anschließenden Western Blot Analyse konnte Crm1 nur in der ungebundenen Fraktion nachgewiesen werden. Um die Spezifität des α -Rec Antikörpers zu zeigen, wurde mit Rec transfiziertes

HL-Zellysate mit Protein G-Sepharose und Präimmunserum inkubiert. Auch hier konnte in der anschließenden Western Blot Analyse Crm1 nicht im Präzipitat nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Mit diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Crm1 in Gegenwart von RanQ69L an Rec bindet.

2.3 Bestimmung des nukleären Exportsignals von Rec

2.3.1 Untersuchung von Mutanten, bei denen die erste oder die zweite leucinreiche Domäne mutiert ist

Nachdem Crm1 als Exportrezeptor für den Rec-vermittelten RNA-Export identifiziert war, stellte sich die Frage nach dem nukleären Exportsignal. Wie bereits erwähnt, bindet Crm1 überwiegend an leucinreiche Exportsignale. Rec besitzt wie in Abbildung 2.9 dargestellt zwei leucinreiche Domänen, die als putative Exportsignale in Frage kommen.

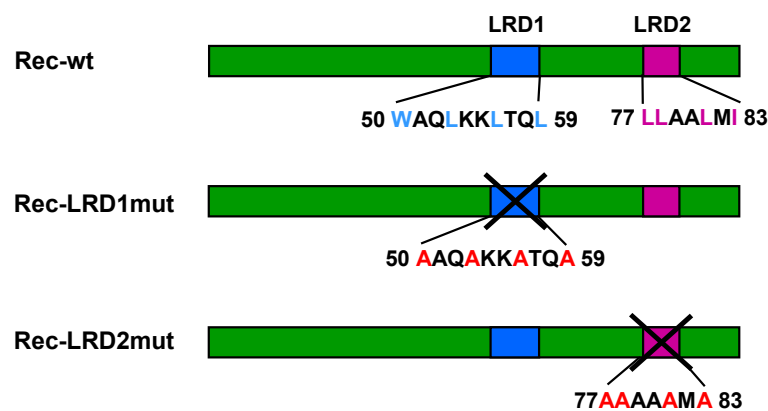


Abb. 2.9: Schematische Darstellung von Rec-wt, Rec-LRD1mut und Rec-LRD2mut. Die mutierten Aminosäuren sind farbig dargestellt. Der Austausch erfolgte in allen Fällen gegen Alanin.

Deshalb wurden zunächst beide Domänen hinsichtlich ihrer Bedeutung für die RNA Exportaktivität von Rec untersucht. Dazu wurden entweder die Leucin-Reste der ersten oder die der zweiten leucinreichen Domäne gegen Alanin-Reste ausgetauscht. Die Mutanten wurden hinsichtlich ihrer Lokalisation und Funktionalität untersucht. Zur Überprüfung der Lokalisation wurden die Mutanten und der Wildtyp als Fusionsproteine mit C-terminalem GFP-Fusionsanteil exprimiert. Dazu wurden die Konstrukte in den

Vektor pEGFP-N1 kloniert. Bereits in Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass ein C-terminaler Fusionsanteil die Lokalisation und Funktion von Rec-wt nicht beeinflusst, wohingegen ein N-terminaler Fusionsanteil zu einer veränderten Lokalisation und zu einer gestörten Funktion führte (unveröffentlichte Daten). In der Fluoreszenzanalyse erfolgte die Detektion der Proteine über die Eigenfluoreszenz des GFP-Anteils.

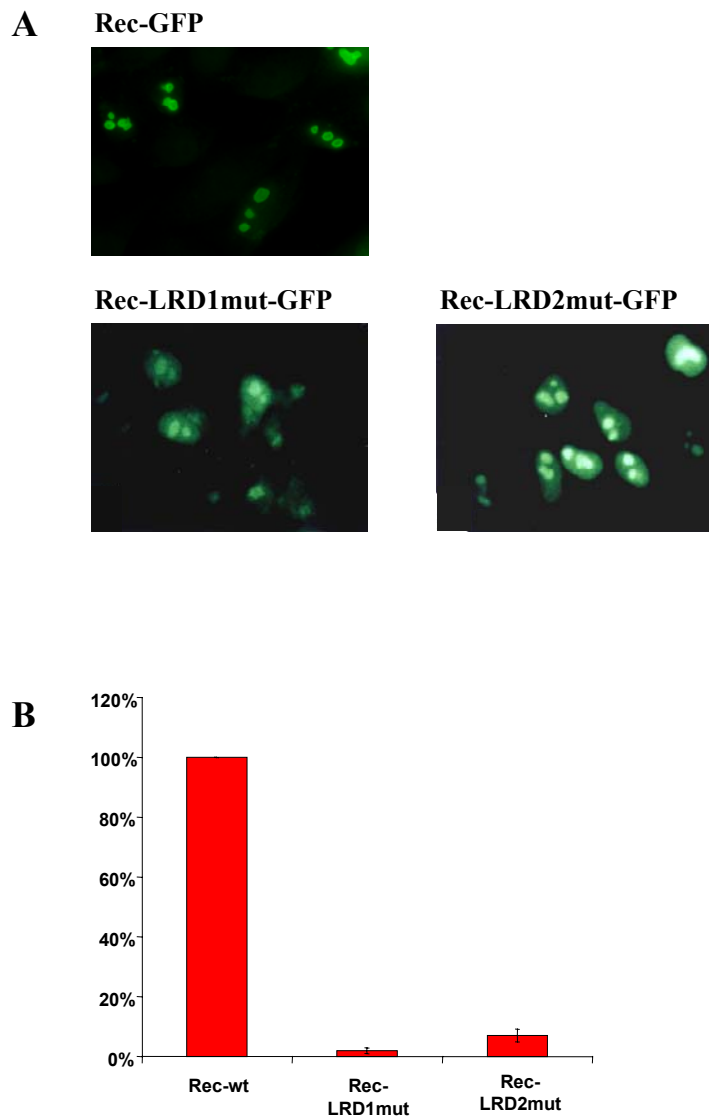


Abb. 2.10: A) Subzelluläre Lokalisation von Rec-wt-GFP, Rec-LRD1mut-GFP und Rec-LRD2mut-GFP. Die Detektion der Proteine erfolgte über die Eigenfluoreszenz des GFP-Anteils.

B) Quantifizierung des HIV Gag Proteins mit Hilfe des HIV Antigen Tests (Abbott). Zur Untersuchung der Funktion von Rec-LRD1mut und Rec-LRD2mut wurden die Vektoren pRec, pRec-LRD1mut und pRec-LRD2mut einzeln mit pHIVgagRcRE in HL-tat-Zellen kotransfiziert.

Rec-GFP ist in den Nukleoli lokalisiert, das Protein konnte nur schwach im Zytoplasma und garnicht im Nukleus nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Wildtyp-Protein zeigen die Mutanten Rec-LRD1mut-GFP und Rec-LRD2mut-GFP deutlich vermehrte Ansammlung im Zellkern, wobei vor allem die Mutante Rec-LRD2mut-GFP das typische Bild einer Exportmutante liefert; das Protein akkumulierte im Zellkern und war nicht im Zytoplasma nachweisbar (Abb. 2.10 A).

Die RNA Exportaktivität der beiden Mutanten wurde mit dem oben beschriebenen HIV Testsystem (siehe 2.2.1) untersucht. Dazu wurden die Plasmide pRec, pRec-LRD1mut und pRec-LRD2mut einzeln mit dem Reporterplasmid pHIVgagRcRE in HL-tat Zellen kotransfiziert. Die Menge an p24, die bei Kotransfektion von pRec mit pHIVgagRcRE gemessen wurde, wurde als 100% gesetzt. Wie aus Abbildung 2.10 B hervorgeht, führt sowohl die Mutation der ersten leucinreichen als auch der zweiten leucinreichen Domäne zum Verlust der RNA-Exportfunktion bei Rec. Da beide leucinreichen Domänen sowohl einen Einfluss auf die Lokalisation von Rec als auch auf die Funktionalität haben, konnte keine Aussage darüber getroffen werden, welche der beiden Domänen das nukleäre Exportsignal bildet.

2.3.2 Feinkartierung der ersten und zweiten leucinreichen Domäne

Im Folgenden sollte untersucht werden, welche Bedeutung den einzelnen Aminosäuren der ersten und zweiten leucinreichen Domäne zukommt. Dazu wurden die in Abbildung 2.11 dargestellten Punktmutanten hergestellt, bei denen das Tryptophan oder einer der drei Leucin-Reste der ersten leucinreichen Domäne sowie entweder einer der drei Leucin-Reste oder das Isoleucin der zweiten leucinreichen Domäne gegen Alanin ausgetauscht wurden. Die verschiedenen Rec-LRD Punktmutanten wurden hinsichtlich ihrer Funktionalität, Lokalisation, Multimerisierung, RcRE Bindung und Crm1 Bindung untersucht.

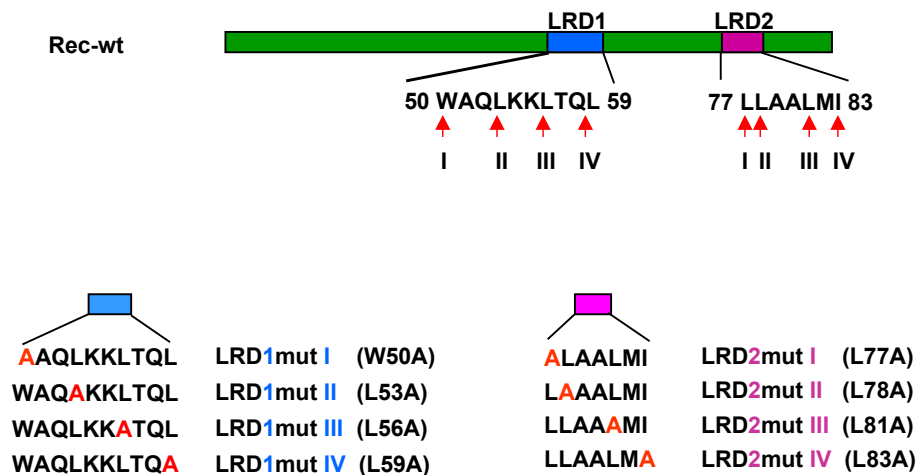


Abb. 2.11: Schematische Darstellung der Rec-LRD Punktmutanten. Die Mutationen sind farblich gekennzeichnet

2.3.3 RNA Exportaktivität der Rec-LRD Punktmutanten

Zunächst wurde mit dem HIV Testsystem untersucht, welche der acht hydrophoben Aminosäuren für die RNA Exportfunktion von Rec relevant sind. Dazu wurden die einzelnen Konstrukte in den Expressionsvektor pCMV kloniert. Die Vektoren pRec-LRD1mutI bis IV und pRec-LRD2mutI bis IV wurden jeweils einzeln mit dem Reporterplasmid pHIVgagRcRE in HL-tat Zellen kotransfiziert. Als Negativkontrolle wurde der Vektor pCMV(-), der kein *rec*-Gen trägt, mit dem Reporterplasmid kotransfiziert. Die HIV Gag Expression wurde mit einem HIV p24 ELISA quantifiziert. Die Transfektionen wurden dreifach, jeweils in Triplikaten durchgeführt.

Da der nukleo-zytoplasmatische Transport des HIV *gag*-Transkriptes über Rec(-Mutanten) erfolgt, musste sichergestellt werden, dass in jedem Versuchsansatz gleiche Mengen an Rec(-Mutanten)-Protein vorliegen. Um dies zu gewährleisten, wurde die Menge an Rec(-Mutanten) Protein im Western Blot bestimmt und Zellysate mit äquivalenten Mengen an Rec- oder mutiertem Rec-Protein in den p24 Test eingesetzt. Aus Abbildung 2.12 B geht hervor, dass ungefähr gleiche Mengen an Rec Protein in den p24 Test eingesetzt wurden. Die Menge an p24, die bei Kotransfektion von pRec mit pHIVgagRcRE gemessen wurde, wurde als 100 % gesetzt. Abbildung 2.12 zeigt, dass bei den Mutanten Rec-LRD1mutI und Rec-LRD1mutII sowie Rec-LRD2mutI der Austausch des Leucins

bzw. bei Rec-LRD1mutI des Tryptophans gegen Alanin zum Funktionsverlust von Rec geführt hat. Auch die Mutation des zweiten Leucins der zweiten leucinreichen Domäne (Rec-LRD2mutII) hat einen drastischen Funktionsverlust von Rec zur Folge. Die Mutation des zweiten und dritten Leucins der ersten leucinreichen Domäne (Rec-LRD1mutIII, Rec-LRD1mutIV) sowie des dritten Leucins und des Isoleucins der zweiten leucinreichen Domäne (Rec-LRD2mutIII, Rec-LRD2mutIV) hat nur eine minimale Auswirkung auf die RNA Exportaktivität von Rec.

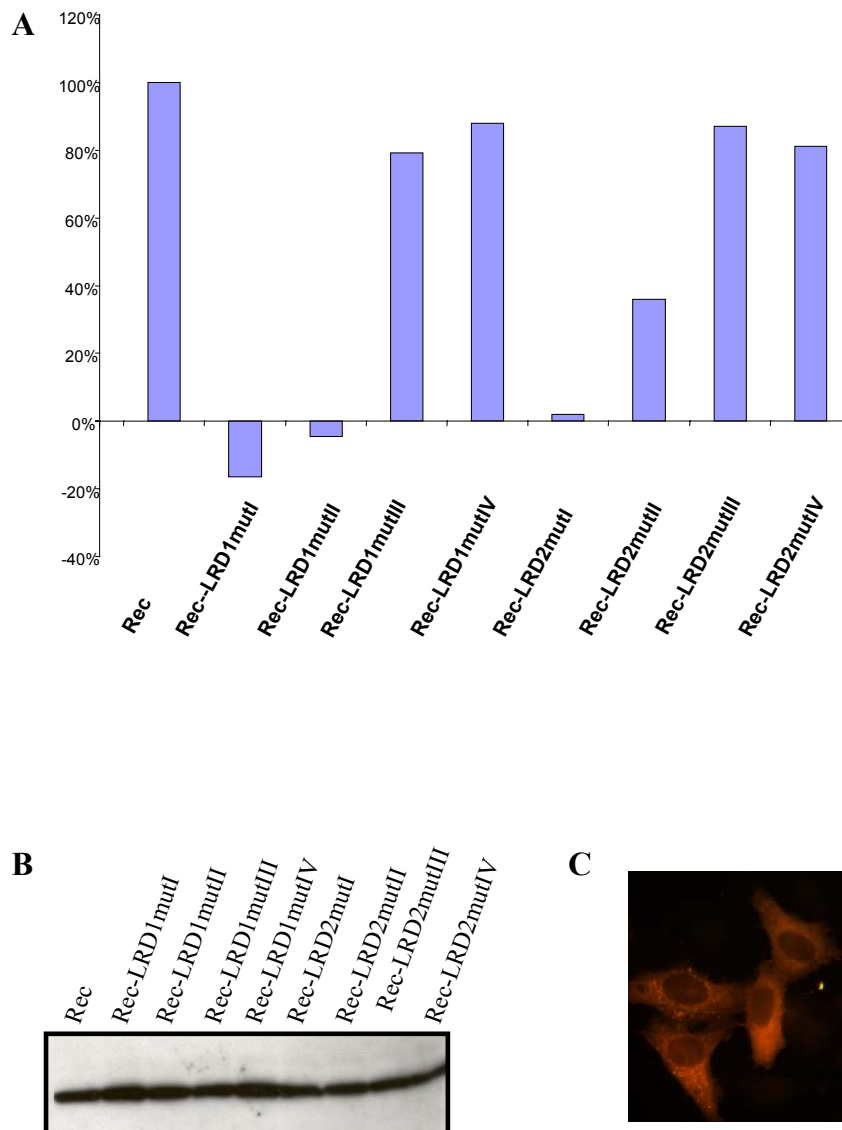


Abb. 2.12: A: Quantifizierung des HIV Gag Proteins mit Hilfe des HIV Antigen Tests (Abbott). Zur Untersuchung der Funktion der Rec-LRD Punktmutanten wurden die Vektoren pRec, pRec-LRD1mutI bis IV sowie pRec-LRD2mutI bis IV einzeln mit pHIVgagRcRE in HL-tat-Zellen kotransfiziert.

B: Überprüfung der im p24 Test eingesetzten Menge an Rec und mutiertem Rec Protein im Western Blot. Die Detektion der Proteine erfolgte mit einem Kaninchen α -Rec Antikörper.

C: Kotransfektion von pRec-LRD1mutIII mit pHIVgagRcRE. Die Färbung von HIV Gag erfolgte mit einem Maus α -p24 Antikörper.

Die HIV Gag Expression wurde nicht nur im p24 Test quantifiziert, sondern auch in der Immunfluoreszenzmikroskopie überprüft. Für die Färbung von HIV Gag wurde ein monoklonaler Maus α -p24 Antikörper verwendet. Es konnte nur nach Kotransfektion von pHIVgagRcRE mit pRec-LRD1mutIII, -IV oder pRec-LRD2mutIII, -IV eine HIV Gag Expression festgestellt werden. Abb. 2.12 C zeigt exemplarisch die HIV Gag Expression nach Kotransfektion von Rec-LRD1mutIII mit pHIVgagRcRE.

Zusammenfassend haben die Untersuchungen ergeben, dass jeweils nur die ersten beiden hydrophoben Aminosäuren aus beiden Domänen für die RNA Exportaktivität von Rec von Bedeutung sind.

Was zum Funktionsverlust der Mutanten Rec-LRD1mutI, Rec-LRD1mutII sowie Rec-LRD2mutI und Rec-LRD2mutII geführt hat, lässt sich anhand des HIV Testsystems nicht sagen, da sowohl fehlende RcRE-Bindung als auch fehlende Crm1 Bindung zum Funktionsverlust führen würden. Bisher ist auch noch nicht untersucht worden, ob Multimerisierung für die biologische Aktivität von Rec von Bedeutung ist. Sollte dies der Fall sein, so würde sich der Verlust der Multimerisierung ebenfalls auf die Exportaktivität von Rec auswirken.

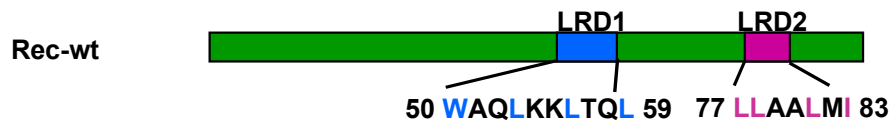
2.3.4 Lokalisation der Rec-LRD Punktmutanten

Die Befunde aus dem Funktionsassay haben bereits gezeigt, dass lediglich die ersten beiden hydrophoben Aminosäuren aus beiden Domänen für die Exportfunktion von Rec relevant sind. Über die subzelluläre Lokalisation der einzelnen Rec-LRD Punktmutanten sollte untersucht werden, ob sich die Punktmutationen auf die Exportrezeptorbindung auswirken. Zur Untersuchung der Lokalisation der Rec Punktmutanten wurden die Konstrukte wieder in den Vektor pEGFP-N1 kloniert. Die Plasmide pRec-GFP, pRec-LRD1mutI-GFP, pRec-LRD1mutII-GFP, pRec-LRD1mutIII-GFP und pRec-LRD1mutIV-GFP sowie pRec-LRD2mutI-GFP, pRec-LRD2mutII-GFP, pRec-LRD2mutIII-GFP und pRec-LRD2mutIV-GFP wurden in HL-Zellen transfiziert. Die Untersuchungen wurden doppelt durchgeführt, wobei die Ergebnisse in allen Fällen identisch waren. Rec-Mutanten, die nicht mehr an den Exportrezeptor binden können, sollten vermehrt im Zellkern akkumulieren. Abbildung 2.13 zeigt die subzelluläre Lokalisation von Rec-wt-GFP. Das Protein ist in den Nukleoli lokalisiert, auch im

Zytoplasma kann das Protein zu einem geringen Anteil nachgewiesen werden. Der Zellkern bleibt überwiegend ausgespart.

Wie aus Abbildung 2.13 hervorgeht, zeigen die Mutanten Rec-LRD1mutI-GFP bis Rec-LRD1mutIII-GFP sowie Rec-LRD2mutI-GFP bis Rec-LRD2mutIII-GFP eine deutliche Ansammlung im Zellkern. Die vermehrte Lokalisation deutet auf einen gestörten Export der Proteine hin. Auch bei der Mutante Rec-LRD2mutIV-GFP kann man einen deutlich eingeschränkten Export feststellen, wenngleich dieser nicht ganz so ausgeprägt ist wie bei den restlichen Mutanten. Nur die Mutante Rec-LRD1mutIV-GFP kann vermehrt im Zytoplasma nachgewiesen werden. Überraschend waren die Ergebnisse für die Mutanten Rec-LRD1mutIII-GFP und Rec-LRD2mutIII-GFP, da diese im Funktionsassay nahezu genauso aktiv waren wie der Wildtyp, in der Immunfluoreszenz jedoch das Bild von Exportmutanten zeigen. Zur Untersuchung, ob der GFP-Fusionsanteil einen Einfluss auf die Funktion der Proteine hat, wurde die Aktivität der GFP-Fusionsproteine mit dem HIV Testsystem überprüft.

A



B

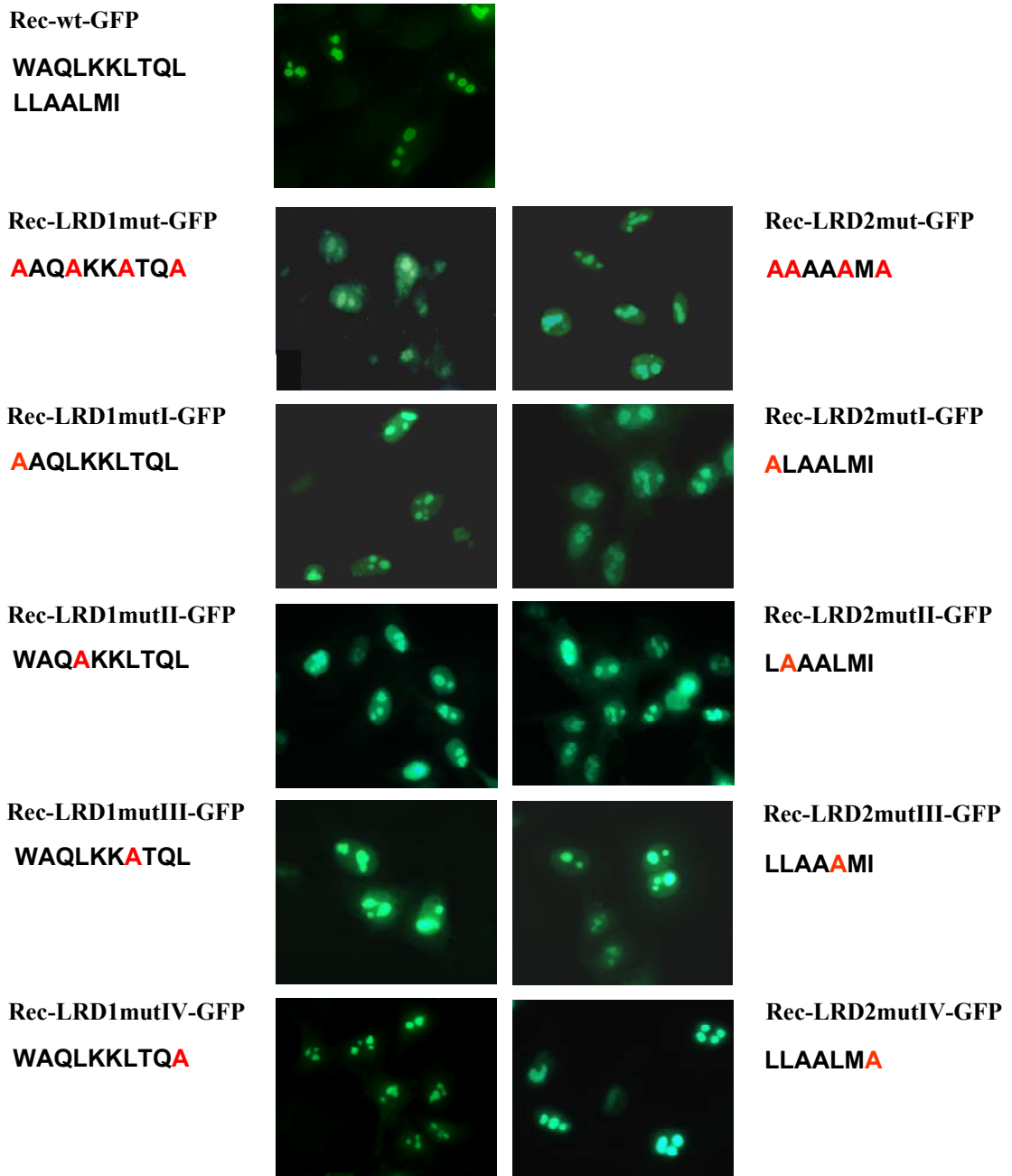


Abb. 2.13: A: Schematische Darstellung von Rec-wt. Aminosäuren, die mutiert wurden, sind farbig hervorgehoben. B: Subzelluläre Lokalisation von Rec-wt-GFP und der mutierten Rec-GFP Proteine. Die Detektion von Rec-wt, der Gesamtmutanten Rec-LRD1mut, Rec-LRD2mut sowie der Punktmutanten Rec-LRD1mutI-IV und Rec-LRD2mutI-IV erfolgte über die Eigenfluoreszenz des GFP-Anteils.

2.3.5 Der GFP-Fusionsanteil verursacht bei Rec-LRD1mutIII und Rec-LRD2mutIII einen Funktionsverlust

Zur Bestimmung der RNA Exportaktivität der GFP-Fusionsproteine wurden die Plasmide pRec-GFP, pRec-LRD1mutI-GFP, pRec-LRD1mutII-GFP, pRec-LRD1mutIII-GFP und pRec-LRD1mutIV-GFP sowie pRec-LRD2mutI-GFP, pRec-LRD2mutII-GFP, pRec-LRD2mutIII-GFP und pRec-LRD2mutIV-GFP einzeln mit dem Reporterplasmid pHIVgagRcRE in HL-tat Zellen kotransfiziert. Als Negativkontrolle wurde der Vektor pEGFP-N1, der kein *rec*-Gen trägt mit dem Reporterplasmid kotransfiziert. Die Transfektionen wurden doppelt, jeweils in Triplikaten durchgeführt. Die HIV Gag Expression wurde mit einem HIV p24 ELISA quantifiziert. Zuvor wurde wieder die Menge an Rec und mutiertem Rec-Protein mittels Western Blot bestimmt und Zellysate mit äquivalenten Mengen an Rec(-Mutanten) in den p24 Test eingesetzt (Abb. 2.14 B). Die Menge an p24, die bei Kotransfektion von pRec-GFP mit pHIVgagRcRE gemessen wurde, wurde als 100 % gesetzt.

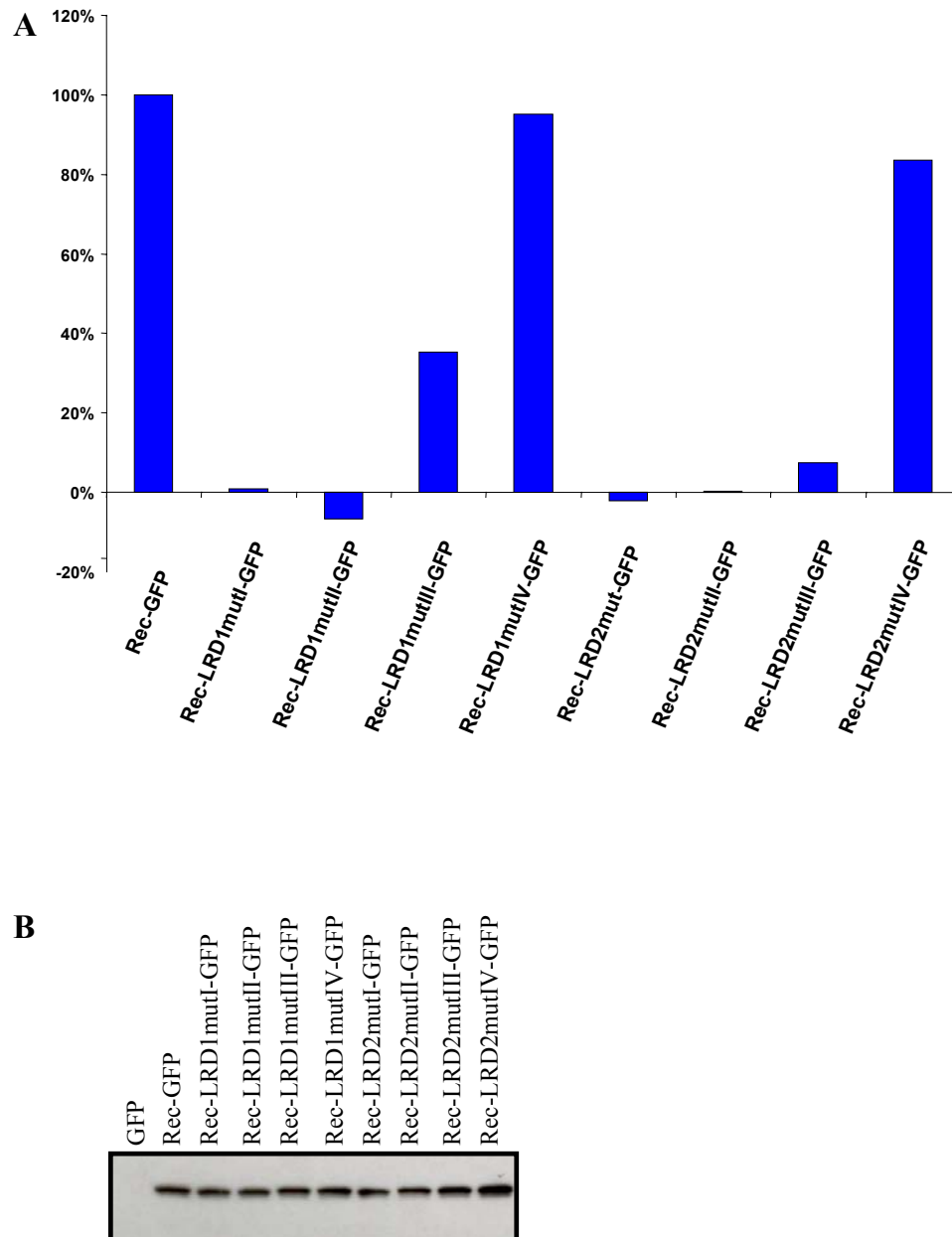


Abb. 2.14: A) Quantifizierung des HIV Gag Proteins mit Hilfe des HIV Antigen Tests (Abbott). Zur Untersuchung der Funktion der mutierten Rec-GFP Fusionsproteine wurden die Vektoren pRec-GFP, pRecLRD1mutI-GFP, pRec-LRD1mutII-GFP, pRec-LRD1mutIII-GFP und pRec-LRD1mutIV-GFP sowie pRec-LRD2mutI-GFP, pRec-LRD2mutII-GFP, pRec-LRD2mutIII-GFP und pRec-LRD2mutIV-GFP einzeln mit pHIVgagRcRE in HL-tat-Zellen kotransfiziert.

B) Überprüfung der im p24 Test eingesetzten Menge an Rec-GFP und mutiertem Rec-GFP im Western Blot. Die Detektion der GFP-Fusionsproteine erfolgte mit einem Kaninchen α -Rec Antikörper.

Wie aus Abbildung 2.14 A hervorgeht, zeigen die Mutanten Rec-LRD1mutI-GFP, Rec-LRD1mutII-GFP sowie Rec-LRD2mutI-GFP, Rec-LRD2mutII-GFP und Rec-LRD2mutIII-GFP keine RNA Exportaktivität mehr. Die Mutante Rec-LRD1mutIII-GFP besitzt nur noch eine geringe Restaktivität von 35%.

Überraschenderweise ist die Mutante Rec-LRD2mutIV trotz nukleärer Lokalisation noch nahezu genauso aktiv wie der Wildtyp. Ein Vergleich der Aktivität von Rec(-Mutanten)-Protein ohne GFP-Fusionsanteil mit der Aktivität von Rec(-Mutanten)-Protein mit GFP-Fusionsanteil zeigt eindeutig, dass die GFP-Markierung zum Funktionsverlust bei Rec-LRD1mutIII und Rec-LRD2mutIII geführt hat.

2.3.6 Die Punktmutationen führen nicht zum Verlust der Exportrezeptorbindung

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass der C-terminale GFP-Fusionsanteil auch bei den Mutanten Rec-LRD1mutI, Rec-LRD1mutII, Rec-LRD2mutI und Rec-LRD2mutII zu einem verminderten Export geführt hat, wurde die Lokalisation der Rec-LRD Punktmutanten ohne GFP-Fusionsanteil untersucht. Dazu wurden die Vektoren pRec, pRec-LRD1mut, pRec-LRD2mut und pRec-LRD1mutI bis IV sowie pRec-LRD2mutI bis IV einzeln in HL-Zellen transfiziert. Die Färbung von Rec und mutiertem Rec-Protein erfolgte über einen Kaninchen α -Rec Antikörper. Die Versuche wurden doppelt durchgeführt, wobei die Ergebnisse in allen Fällen identisch waren. Dabei zeigte sich, dass alle Rec-LRD Punktmutanten noch zwischen Kern und Zytoplasma pendeln können, wenngleich die Rec-LRD Punktmutanten im Vergleich zum Wildtyp-Protein eine vermehrte Ansammlung im Zellkern gezeigt haben (Abb. 2.14 B). Der Vergleich der Befunde aus den Lokalisationsstudien mit markiertem und nicht markiertem Rec-Protein hat gezeigt, dass der C-terminale GFP-Fusionsanteil nicht nur bei den Mutanten Rec-LRD1mutIII und Rec-LRD2mutIII einen Funktionsverlust verursacht hat, sondern auch bei den restlichen Mutanten zu einer ausschließlich nukleolären und nukleären Lokalisation geführt hat. Das Bild einer echten Exportmutante lieferte ausschließlich die Mutante Rec-LRD2mut. Das Protein konnte nur in den Nukleoli und im Zellkern detektiert werden. Die Gesamtmutante Rec-LRD1mut war hingegen diffus innerhalb der ganzen Zelle zu finden. Zusammenfassend haben die Lokalisationsstudien ergeben, dass keine der Punktmutationen zum Verlust der Exportrezeptorbindung geführt hat. Die Untersuchung der Lokalisation der Mutanten Rec-LRD1mut und Rec-LRD2mut haben jedoch sehr deutlich gezeigt, dass das nukleäre Exportsignal von Rec im Bereich der zweiten leucinreichen Domäne lokalisiert ist.

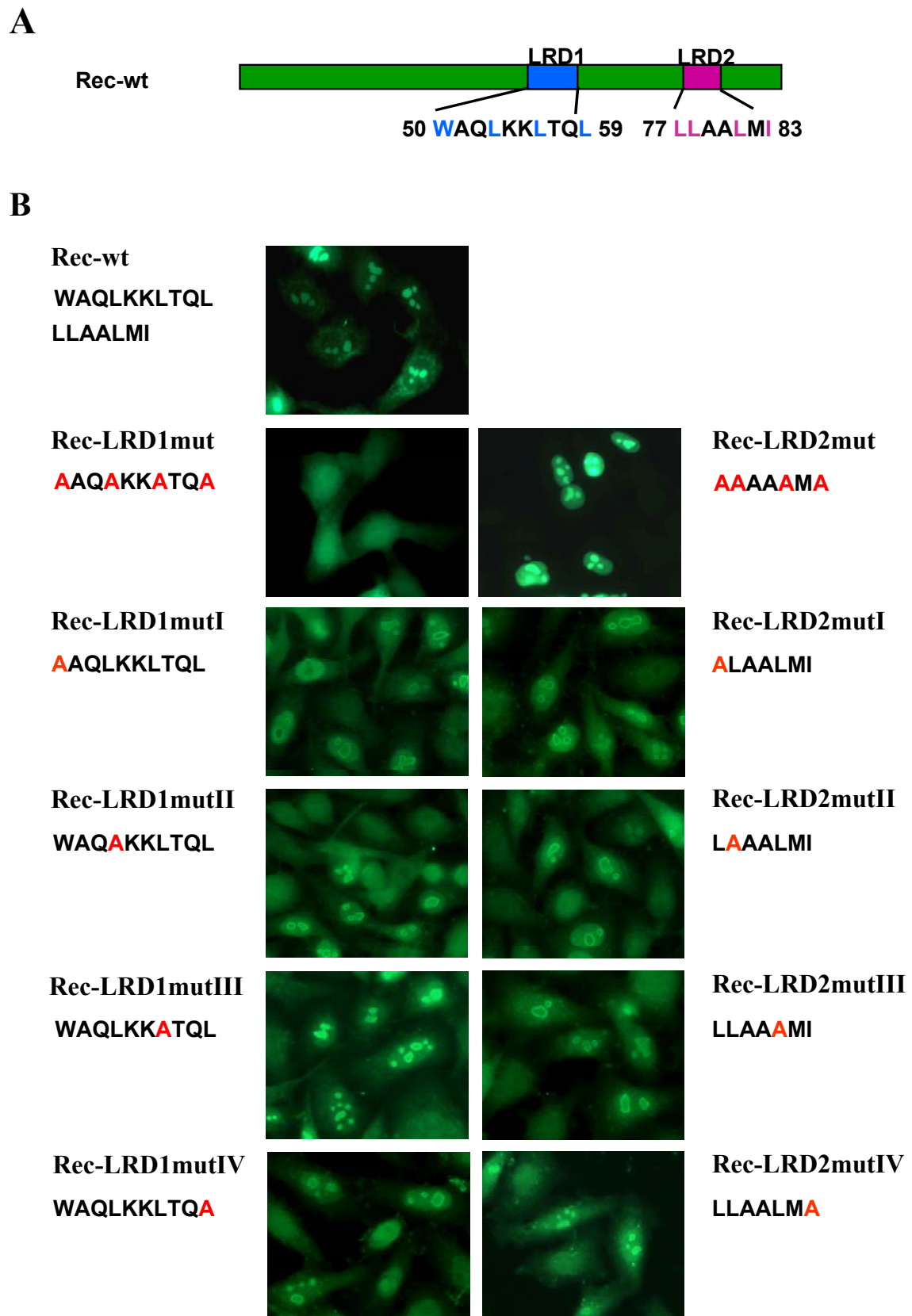


Abb. 2.15: A: Schematische Darstellung von Rec-wt. Aminosäuren, die mutiert wurden sind farbig hervorgehoben. B: Subzelluläre Lokalisation von Rec-wt, Rec-LRD1mut, Rec-LRD1mutI-IV sowie Rec-LRD2mut und Rec-LRD2mutI-IV. Die Färbung von Rec und Rec-Mutanten erfolgte über einen Kaninchen α -Rec Antikörper.

2.3.7 Punktmutationen im Bereich der leucinreichen Domänen führen nicht zum Verlust des Crm1-Bindevermögens von Rec

Die Lokalisationsstudien haben bereits gezeigt, dass keine der Punktmutationen zu einem Verlust der Exportrezeptorbindung geführt hat. Im Folgenden sollte zur Bestätigung dieses Ergebnisses das Crm1 Bindevermögen der einzelnen Rec-Punktmutanten mittels Ko-Immunpräzipitation untersucht werden. Dazu wurden die Plasmide pRec, pRec-LRD1mutI-IV und pRec-LRD2mutI-IV in HL-Zellen transfiziert. Die Ko-Immunpräzipitation aus den Zellysaten erfolgte über einen Kaninchen α -Rec Antikörper der an Protein G-Sepharose gekoppelt wurde.

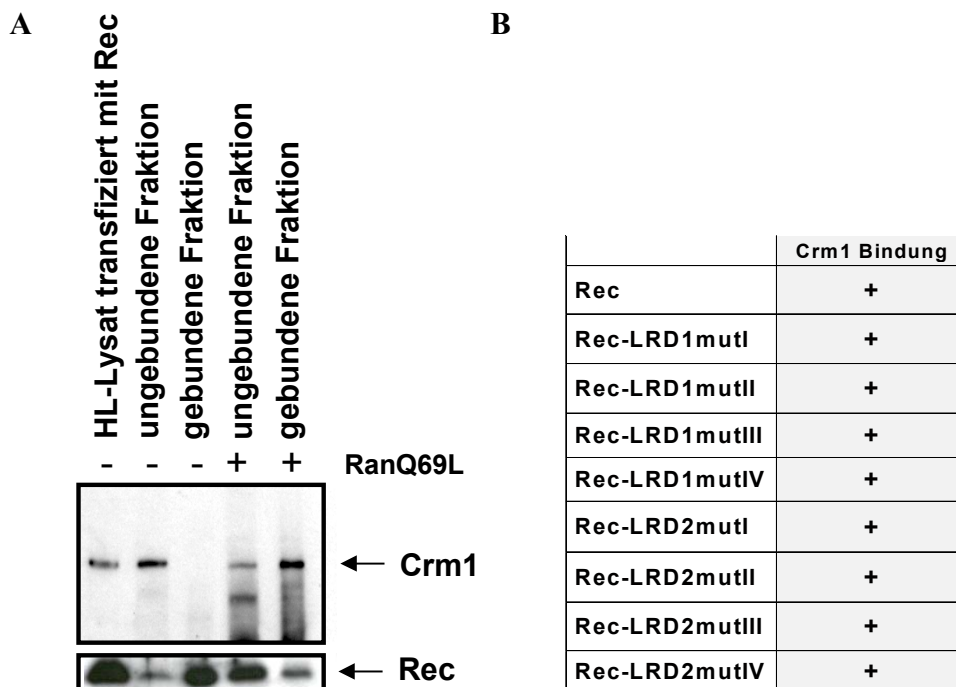


Abb. 2.16: A) Überprüfung des Crm1-Bindevermögens der Rec-LRD Punktmutanten im Western Blot. Nach der Immunpräzipitation wurden die gebundenen und ungebundenen Fraktionen im Western Blot analysiert. Der Nachweis von Crm1 erfolgte mit einem polyklonalem α -Crm1 Antikörper, der Nachweis von Rec mit einem Kaninchen α -Rec Antikörper. Die Immunpräzipitation wurde mit einem α -Rec Antikörper durchgeführt.

B) Tabellarische Zusammenfassung der Ko-Immunpräzipitationsergebnisse.

Da sich die Bindung von Crm1 an Rec nur in Gegenwart von RanGTP nachweisen lässt, wurde auch hier gereinigtes rekombinantes RanQ69L, eine GTPase defiziente Mutante, zu dem Versuchsansatz zugegeben. Als Negativkontrolle wurde untransfiziertes HL-Lysat verwendet. Die gebundenen und ungebundenen Fraktionen wurden anschließend im

Western Blot analysiert. Dabei erfolgte der Nachweis von Crm1 über einen polyklonalen α -Crm1 Antikörper und der Nachweis von Rec über einen Kaninchen α -Rec Antikörper. Wie aus Abbildung 2.16 B hervorgeht, konnte unter wenig stringenten Bedingungen (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0,1% NP40) für alle Rec-LRD Punktmutanten eine Crm1-Bindung gezeigt werden. Damit bestätigen die Ergebnisse der Crm1-Bindungsstudien die Befunde aus den Lokalisationsstudien mit mutiertem Rec-Protein ohne GFP-Fusionsanteil. Jedoch konnte unter diesen wenig stringenten Bedingungen Crm1 in geringem Maße auch in der gebundenen Fraktion von untransfiziertem HL-Lysat nachgewiesen werden, wobei das Signal deutlich schwächer war als bei den restlichen Proben (Daten nicht gezeigt).

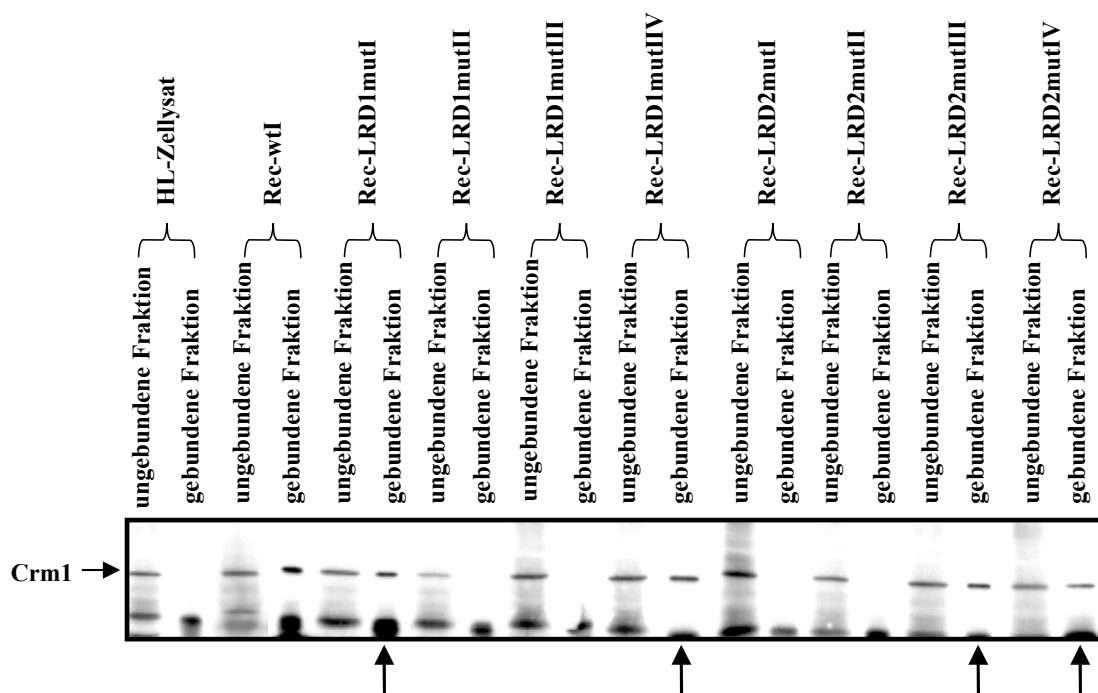


Abb. 2.17: Überprüfung des Crm1 Bindevermögens der Rec-LRD Punktmutanten unter stringenteren Bedingungen im Western Blot.

Nach der Immunpräzipitation wurden die gebundenen und ungebundenen Fraktionen im Western Blot analysiert. Der Nachweis von Crm1 erfolgte mit einem polyklonalem α -Crm1 Antikörper.

Unter stringenteren Bedingungen (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0,1% NP40, 2mM Mercaptoethanol, 0,4% Magermilch) konnte wie in Abbildung 2.17 dargestellt, nur noch für die Mutanten Rec-LRD1mutI, Rec-LRD1mutIV und Rec-LRD2mutIII sowie Rec-LRD2mutIV eine Crm1 Bindung gezeigt werden. Die Untersuchungen zum Crm1 Bindevermögen haben ergeben, dass alle Rec-Mutanten noch

an Crm1 binden können, dass aber das Crm1-Bindevermögen der Mutanten Rec-LRD1mutI, Rec-LRD1mutIII und Rec-LRD2mutI und Rec-LRD2mutII vermindert ist. Desweiteren hat sich gezeigt, dass Mutationen im Bereich der ersten leucinreichen Domäne ebenfalls einen Einfluss auf die Crm1-Bindung haben, obwohl das Rec NES im Bereich der zweiten leucinreichen Domänen lokalisiert ist. Diese verringerte Crm1-Bindung scheint jedoch keinen Einfluss auf die Funktion von Rec zu haben.

2.3.8 Multimerisierung der LRD-Punktmutanten mit Rec-NLSmut-GFP

Wie aus den Ergebnissen der Lokalisations- und Crm1-Bindungsstudien hervorgeht, ist der Funktionsverlust der Mutanten Rec-LRD1mutI, Rec-LRD1mutII sowie Rec-LRD2mutI und Rec-LRD2mutII nicht auf den Verlust der Exportrezeptorbindung zurückzuführen. Für HIV/Rev und HTLV/Rex konnte bereits gezeigt werden, dass Multimerisierung für die biologische Aktivität der Proteine von Bedeutung ist. Auch Rec besitzt von Aminosäure 26 bis 87 ein Helix-Loop-Helix Motiv, das als putative Multimerisierungsdomäne in Frage kommt. Innerhalb des Helix-Loop-Helix Motivs liegt nur die erste leucinreiche Domäne. Bereits in früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass Rec multimerisieren kann, das aber sowohl die Mutation der ersten als auch der zweiten leucinreichen Domäne zum Verlust der Multimerisierung bei Rec führt. Dass auch die Mutation der zweiten leucinreichen Domäne die Multimerisierungsaktivität von Rec beeinträchtigt, liegt möglicherweise an einer veränderten Konformation des Proteins, die eine Multimerisierung nicht mehr zulässt.

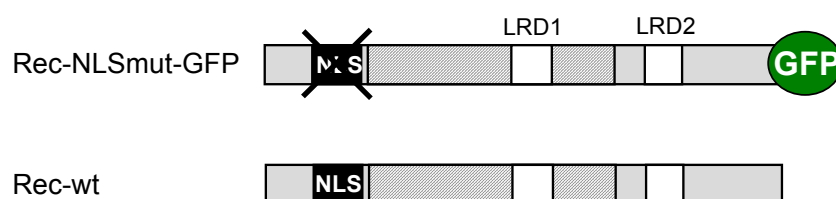


Abb. 2.18: Schematische Darstellung von Rec-NLSmut-GFP und Rec-wt

Da Punktmutationen im Bereich der leucinreichen Domänen zum Funktionsverlust von Rec geführt haben, sollte nun untersucht werden, ob dieser Aktivitätsverlust auf eine gestörte Multimerisierung zurückzuführen ist. Dazu wurden die Vektoren pRec, pRec-LRD1mutI bis IV und pRec-LRD2mutI bis IV einzeln mit pRec-NLSmut-GFP

kotransfiziert. Von den exprimierten Proteinen trägt nur die Rec-NLS-Mutante einen C-terminalen GFP-Fusionsanteil (Abb. 2.18). Über den GFP-Fusionsanteil erfolgte die Detektion des Proteins innerhalb der Zelle. Da die übrigen Rec-Proteine keinen Fusionsanteil tragen, können sie in der Fluoreszenzmikroskopie auch nicht detektiert werden. Das Experiment basiert auf folgender Überlegung: da bei der Mutante Rec-NLSmut das nukleäre Importsignal zerstört ist, ist dieses Protein normalerweise ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert und nicht in den Nukleoli nachweisbar. Kann das Protein nach Kotransfektion mit Rec oder einer der Rec-Mutanten auch in den Nukleoli oder im Zellkern nachgewiesen werden, so kann dies nur durch Dimerisierung mit Rec oder den Rec-Mutanten zustande gekommen sein. Wie aus Abbildung 2.19 hervorgeht, kann Rec-NLSmut-GFP nach Kotransfektion mit Rec-wt auch in den Nukleoli nachgewiesen werden. Die Abbildung zeigt aber auch, dass Rec-NLSmut-GFP nach Kotransfektion mit jeder einzelnen Rec-LRD Punktmutante in den Nukleoli und im Zellkern nachgewiesen werden kann. Nach Kotransfektion von Rec-NLSmut-GFP mit Rec-LRD1mut oder Rec-LRD2mut ist dies nicht der Fall (Abb. 2.19). Dies bedeutet, dass die Punktmutationen im Bereich der leucinreichen Domänen keinen Einfluß auf die Multimerisierungsaktivität von Rec mit Rec-NLSmut-GFP haben. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass dieses Testsystem ausschließlich die Heteromultimerisierung der Rec-LRD Punktmutanten mit Rec-NLSmut-GFP untersuchen kann. Es wurde nicht getestet, ob die Punktmutanten noch homomultimerisieren können.

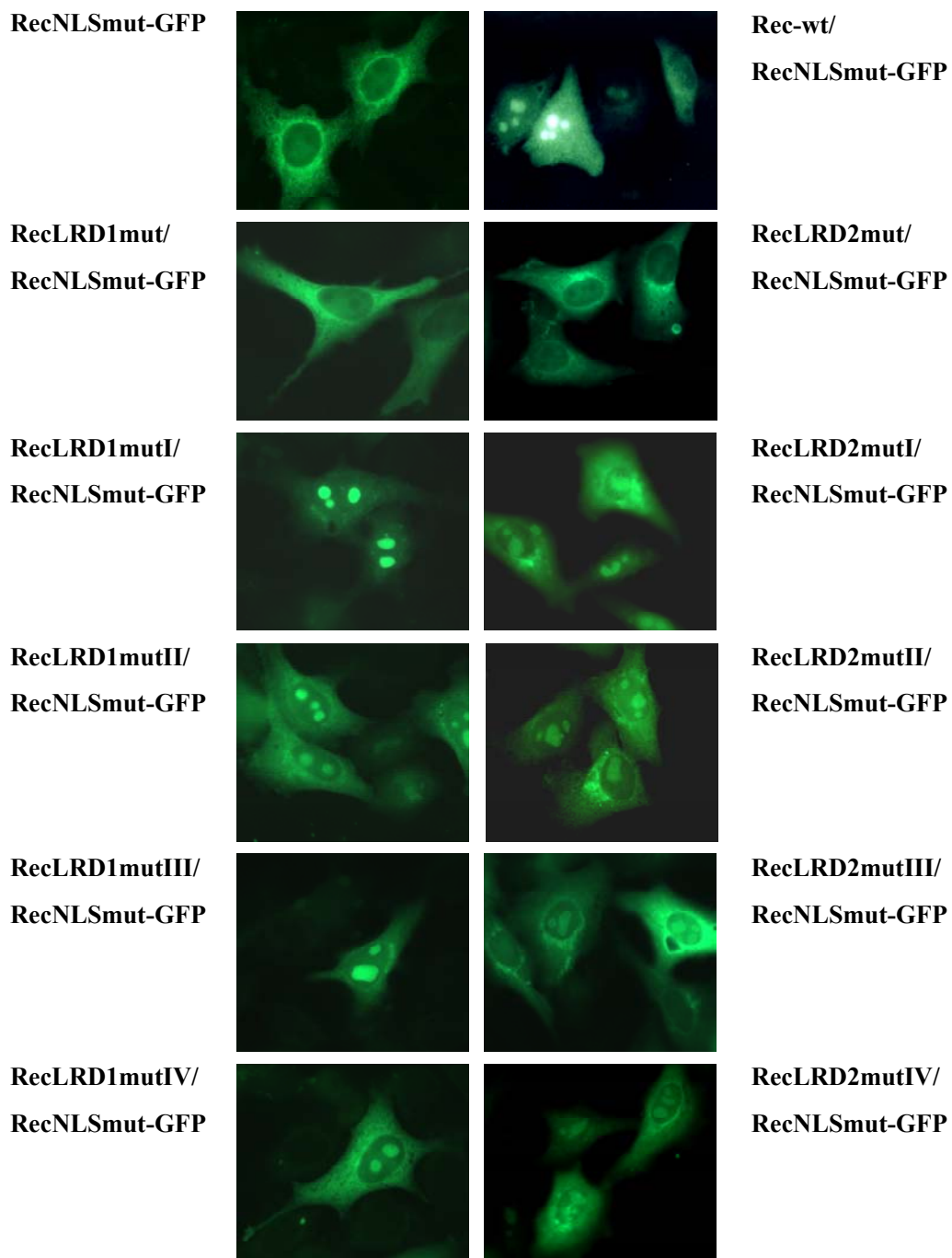


Abb. 2.19: Multimerisierung der Rec-Mutanten mit Rec-NLSmut-GFP:

Zur Überprüfung des Multimerisierungsvermögens der Rec-Mutanten wurden die Plasmide pRec, pRec-LRD1mut, pRec-LRD1mutI-IV sowie pRec-LRD2mut und pRec-LRD2mutI-IV einzeln mit Rec-NLSmut-GFP in HL-Zellen kotransfiziert. Nur Rec-NLSmut wird als GFP Fusionsprotein exprimiert. Über den GFP-Fusionsanteil erfolgt die Detektion des Proteins in der Zelle. Rec-NLSmut-GFP alleine zeigt eine zytoplasmatische Lokalisation, das Protein ist nicht in den Nukleoli detektierbar. Nach Kotransfektion mit pRec kann Rec-NLSmut-GFP durch Multimerisierung mit Rec-wt auch in den Nukleoli nachgewiesen werden. Über die Lokalisation von Rec-NLSmut-GFP nach Kotransfektion mit den einzelnen Rec-Mutanten wurde das Multimerisierungsvermögen der Rec-Mutanten bestimmt.

2.3.9 RcRE-Bindung der Rec-LRD Punktmutanten

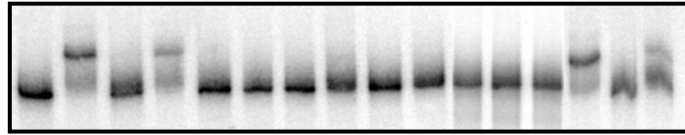
Der Funktionsverlust der Punktmutanten Rec-LRD1mutI, Rec-LRD1mutII, Rec-LRD2mutI und Rec-LRD2mutII könnte auch auf den Verlust der RcRE Bindung zurückzuführen sein.

Bei Rev und Rex konnte bereits gezeigt werden, dass sich die RNA-Bindedomäne im Bereich der argininreichen Domäne befindet. Aufgrund der funktionellen und strukturellen Homologien zu Rev und Rex wurde auch bei Rec die argininreiche Domäne hinsichtlich ihrer Bedeutung für die RcRE-Bindung untersucht. Dabei wurde mit dem in Abschnitt 2.1. beschriebenen RNA-Gelshiftassay festgestellt, dass nach Mutation der argininreichen Domäne Rec nicht mehr an sein RcRE binden kann (Daten nicht gezeigt). Wie in Abschnitt 2.1 beschrieben, erfolgt bei Rec, anders als bei Rev und Rex, die Bindung an das RcRE nicht über ein sequenzspezifisches Motiv, sondern über eine komplexe, gefaltete RNA-Struktur. Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass neben der argininreichen Domäne noch weitere Kontaktbereiche zwischen Rec und RcRE existieren und dass eine Bindung von Rec an sein RcRE eine ganz bestimmte Faltung bei Rec voraussetzt. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Einführung von Punktmutationen im Bereich der leucinreichen Domäne Auswirkungen auf das RNA-Bindevermögen von Rec hat.

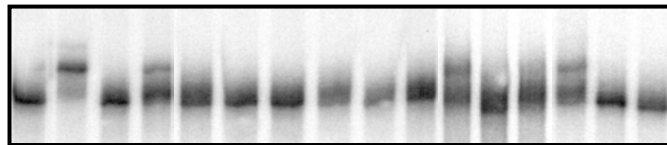
Das RcRE-Bindevermögen der einzelnen Rec-LRD Punktmutanten wurde wieder mittels einer RNA-Gelshift Analyse mit *in vitro* transkribierter radioaktiv markierter RNA untersucht. Wie in Abschnitt 2.1 beschrieben, bindet Rec spezifisch an die biologisch aktive pcK30 RcRE RNA, aber nicht an die biologisch inaktive LTR21 RcRE RNA (Abb. 2.3). Für die folgenden Untersuchungen wurde die pcK30 RcRE RNA als Sonde und auch als Kompetitor zum Nachweis einer spezifischen HERV-K RcRE Bindung verwendet. Die biologisch inaktive LTR21 RcRE RNA diente als Kompetitor zum Nachweis einer unspezifischen RcRE-Bindung. Zur Untersuchung des RNA-Bindevermögens wurden die einzelnen Rec-LRD Punktmutanten rekombinant in *E. coli* exprimiert und anschließend über Ionenaustausch-Chromatographie aufgereinigt. Die Reinheit der rekombinanten Rec-Proteine wurde in einem Coomassie gefärbten SDS Polyacrylamidgel überprüft. Wie aus Abbildung 2.18 B hervorgeht, war es möglich, in einem Einschrittverfahren mittels Ionenaustausch-Chromatographie, die Proteine mit einer Reinheit von über 90% zu erhalten. Die Elution der Proteine erfolgte über einen Salzgradienten, dabei wurden die einzelnen Rec-LRD Punktmutanten mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen eluiert. Die gereinigten Proteine tragen keinen Fusionsanteil. Es wurden jeweils gleiche Mengen (9 ng)

an Rec-Wildtyp und mutiertem Rec-Protein in die RNA-Protein-Bindungsstudien eingesetzt. Die Proteinkonzentration wurde über Bradford bestimmt.

A



Protein	-	Rec-wt				Rec-LRD1mutI			Rec-LRD1mutII			Rec-LRD1mutIII			Rec-LRD1mutIV		
Competitor (60 ng): pcK30 RcRE	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Competitor (60 ng): LTR21 RcRE	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Probe:	pcK30 RcRE																



Protein	-	Rec-wt				Rec-LRD2mutI			Rec-LRD2mutII			Rec-LRD2mutIII			Rec-LRD2mutIV		
Competitor (60 ng): pcK30 RcRE	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Competitor (60 ng): LTR21 RcRE	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Probe:	pcK30 RcRE																

B

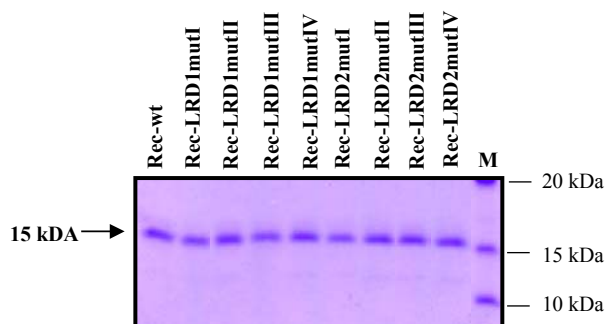


Abb. 2.20: A) RcRE Bindevermögen der Rec-LRD Punktmutanten. Es wurden je 9 ng rekombinantes gereinigtes Rec-wt Protein oder mutiertes Rec-Protein mit 21000 cpm ^{32}P markierter pcK30 RcRE RNA inkubiert. Der Nachweis der spezifischen Bindung erfolgte über Konkurrenz mit nicht-markierter pcK30 RcRE RNA (spezifisch) oder LTR21 RcRE RNA (unspezifisch).

B) Überprüfung der gereinigten Rec-Proteine im Coomassie gefärbten Gel.

Wie aus Abbildung 2.20 hervorgeht, zeigt die Sonde nur nach Inkubation mit Rec-LRD1mutIV, LRD2mutIII und LRD2mutIV eine verringerte Mobilität, wie man sie auch bei Inkubation mit dem Wildtyp-Protein erhält. Die übrigen Mutanten zeigen unter den verwendeten Bedingungen keine RNA-Bindung. Jedoch zeigen die Kompetitionsergebnisse, dass es sich nur bei der Mutante Rec-LRD1mutIV um eine spezifische pcK30 RcRE RNA-Bindung handelt, die beiden Mutanten Rec-LRD2mutIII und Rec-LRD2mutIV binden auch an die biologisch inaktive LTR21 RcRE RNA. Zu dem Verlust der RcRE RNA-Bindung bei Rec-LRD1mutI, LRD1mutII und LRD1mutIII sowie Rec-LRD2mutI und Rec-LRD2mutII ist es wahrscheinlich aufgrund von Konformationsänderungen gekommen. Dass die Mutanten Rec-LRD2mutIII und LRD2mutIV sowohl an die pcK30 als auch an die LTR21 RcRE RNA binden können, ist vermutlich ebenfalls auf eine veränderte Faltung der Proteine zurückzuführen. Schaut man sich die Ergebnisse für die Mutanten Rec-LRD2mutI und Rec-LRD2mutII etwas genauer an, so kann man auch hier eine leichte Retardierung der Sonde in Form eines „Schmiers“ erkennen. Im Folgenden sollte deshalb untersucht werden, ob bei Einsatz einer höheren Proteinmenge auch bei den übrigen Rec-Mutanten eine RNA-Bindung festzustellen ist. Desweiteren sollte untersucht werden, ob es Unterschiede zwischen den Retardierungsmustern der aktiven und der inaktiven Rec-Mutanten gibt. Für die Untersuchungen wurde ebenfalls die pcK30 RcRE RNA als Sonde verwendet. Vom Wildtyp-Protein wurden 9 ng, 18 ng, 27 ng und 36 ng eingesetzt und von den Rec-Punktmutanten jeweils 36 ng.

Wie aus Abbildung 2.21 hervorgeht, kann bei Verwendung von 36 ng gereinigtem rekombinantem Rec- und mutiertem Rec-Protein für alle Rec-LRD Punktmutanten eine Bindung an die pcK30 RcRE RNA Sonde gezeigt werden. Ein Retardierungsmuster, wie man es bei Verwendung des Wildtyp-Proteins erhält, zeigen aber nur die Mutanten Rec-LRD1mutIV und Rec-LRD2mutIV. Beide Rec-Mutanten sind funktional. Bei Verwendung der ebenfalls im Funktionsassay aktiv getesteten Mutante Rec-LRD2mutIII erhielt man eine schwache stärker retardierte Bande, jedoch stimmt die Höhe dieser stärker retardierten Bande nicht mit der Höhe der stärker retardierten Bande bei Rec-wt überein. Auch bei Verwendung der *in vivo* aktiv getesteten Mutante Rec-LRD1mutIII wurde nicht das Wildtyp-Retardierungsmuster erhalten. Bei Verwendung dieser Mutante konnte nur eine Bande verringerter Mobilität gezeigt werden. Sowohl bei der Mutante Rec-LRD1mutIII als auch bei Rec-LRD2mutIII handelt es sich um faltungssensitive

Mutanten. Möglicherweise besitzt das rekombinant exprimierte Protein eine andere Faltung als das eukaryotisch exprimierte.

Zusammenfassend haben die RcRE-Bindungsstudien ergeben, dass durch Punktmutationen sowohl im Bereich der ersten als auch im Bereich der zweiten leucinreichen Domäne das RcRE-Bindevermögen von Rec stark beeinträchtigt wird. Des Weiteren konnte nur mit aktiven Rec-Mutanten ein Retardierungsmuster gezeigt werden, das auch mit dem Wildtyp-Protein erhalten wird.

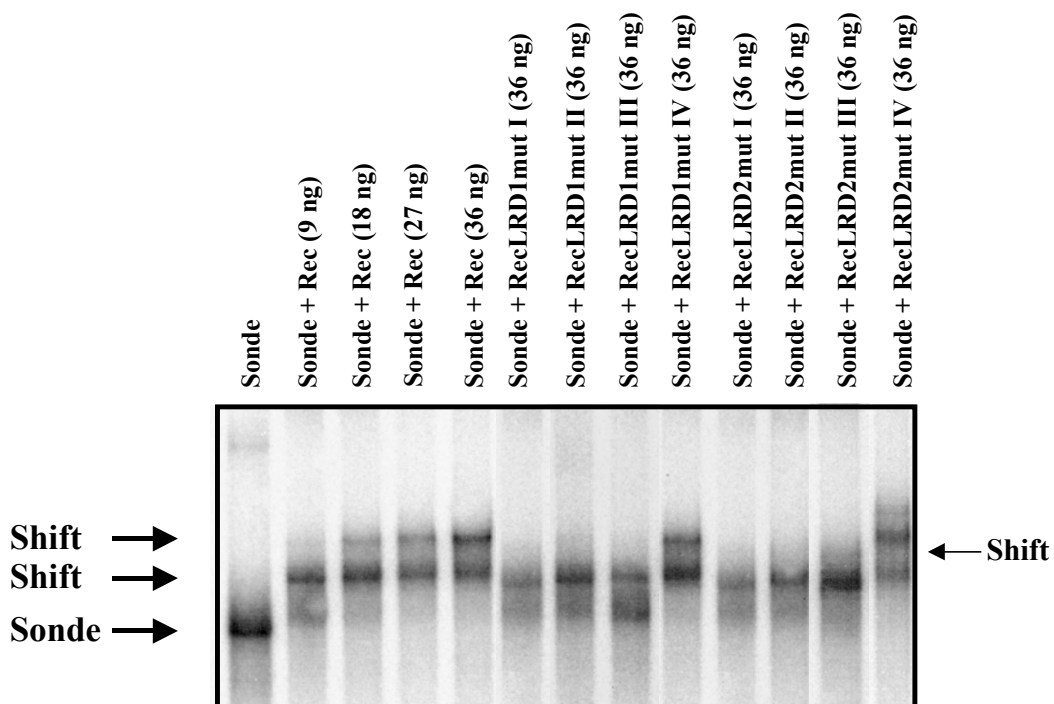


Abb. 2.21: Untersuchung des RcRE-Bindevermögens der Rec-LRD Punktmutanten bei Verwendung von 36 ng gereinigtem mutierten Rec-Protein.

2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Untersuchungen zur ersten und zweiten leucinreichen Domäne sollten anfänglich der Charakterisierung des NES von Rec dienen. Im Verlaufe unserer Analysen konnten wir zeigen, dass sich das NES von Rec nicht, wie von Boese und Mitarbeitern publiziert, im Bereich der ersten leucinreichen Domäne befindet (Boese et al., 2000), sondern im Bereich der zweiten leucinreichen Domäne lokalisiert ist. Die Mutation einer einzelnen hydrophoben Aminosäure im Bereich der zweiten leucinreichen Domäne reicht jedoch

nicht aus, um das NES von Rec zu zerstören. Jedoch führte bereits die Mutation einer einzelnen hydrophoben Aminosäure sowohl im Bereich der ersten als auch im Bereich der zweiten leucinreichen Domäne zu einem drastisch reduzierten RcRE-Bindevermögen bei Rec. Zu dem Verlust des RNA-Bindevermögens ist es wahrscheinlich aufgrund einer veränderten Proteinfaltung der Rec-LRD Punktmutanten gekommen. Die Untersuchungen zum RcRE haben ergeben, dass Rec über eine komplexe, gefaltete RNA Struktur an das RcRE bindet (Magin-Lachmann et al., 2001). Dabei erfolgt die Bindung wahrscheinlich über mehrere Kontaktpunkte. Diese Befunde stimmen mit den Ergebnissen, die wir in dieser Arbeit erhalten haben überein. Mit den RNA-Protein-Bindungsstudien konnten wir zeigen, dass neben der argininreichen Domäne auch die beiden leucinreichen Domänen für die RcRE-Bindung von Bedeutung sind. Die Aminosäuren aus dieser Domäne sorgen wahrscheinlich für die richtige Faltung von Rec, die ebenso von Bedeutung zu sein scheint wie die richtige Faltung des RcREs.

	Funktion	Lokalisation			Crm1 Bindung		Multimerisierung mit Rec-NLSmut-GFP	RcRE Bindung
		Z	K	N	if	ip		
Rec-wt	+	+	+/-	+++	+	+	+	+
Rec-LRD1mutI	-	+/-	++	++	+	+	+	-
Rec-LRD1mutII	-	+/-	++	++	+	+	+	-
Rec-LRD1mutIII	+	+/-	++	++	+	+	+	-
Rec-LRD1mutIV	+	+/-	++	++	+	+	+	+
Rec-LRD1mut	-	+	+	+	+	nt	-	-
Rec-LRD2mutI	-	+/-	++	++	+	+	+	-
Rec-LRD2mutII	-	+/-	++	++	+	+	+	-
Rec-LRD2mutIII	+	+/-	++	++	+	+	+	+
Rec-LRD2mutIV	+	+/-	++	++	+	+	+	+
Rec-LRD2mut	-	-	+++	+++	-	nt	-	nt

Abb.: 2.22 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Untersuchungen zur ersten und zweiten leucinreichen Domäne von Rec. if: Immunfluoreszenzanalyse, ip: Immunpräzipitation, K: Kern, N: Nukleolus, Z: Zytoplasma, nt: nicht getestet

3 Diskussion

3.1 Die Bindung von Rec an sein responsives Element erfolgt über eine komplexe, gefaltete RNA-Struktur

Für den Export der Vollängen- und unvollständig gespleißten viralen Transkripte binden die regulatorischen RNA-Adaptor-Proteine Rev, Rex und Rec an charakteristische Bereiche auf der viralen RNA, die responsiven Elemente. Bei Rev wird dieses Element als RRE und bei Rex als RxRE bezeichnet. Diese Elemente besitzen eine komplexe Sekundärstruktur. Die Bindung von Rev und Rex an ihre jeweiligen responsiven Elemente wurde bereits genau untersucht. Rev und Rex binden über ihre argininreichen Domänen an einen sequenzspezifischen Bereich in einer „Stem-Loop“-Struktur des responsiven Elementes. Dabei kommt es zu Interaktionen zwischen Arginin-Resten der entsprechenden RNA-Bindedomäne und spezifischen Nukleotiden des jeweiligen responsiven Elementes (Kjems et al., 1992; Tan et al., 1993). Rev bindet an die Sequenz 5' UGGGCG/ 5' CGGUACA, die innerhalb eines „Stems“ einen internen „Loop“ ausbildet. Für Rex konnte die Sequenz 5'CUCAGGUCGA/5'(U)CCCUUGGAG als Bindestelle definiert werden (Ahmed et al., 1991; Ahmed et al., 1990).

Unsere Arbeitsgruppe hat das HERV-K/Rec responsive Element (RcRE) genauer untersucht (Magin-Lachmann et al., 2001). In einer computergestützten Vorhersage über die energetisch wahrscheinlichste Sekundärstruktur hat sich gezeigt, dass das HERV-K RcRE aus einer komplexen, gefalteten RNA Sekundärstruktur mit zahlreichen „Stem-Loops“ besteht (Abb. 2.2). Der verwendete Algorithmus basiert auf dem von Zuker entwickelten RNA-Faltungsmodell (Jaeger et al., 1989; Zuker, 1989; Zuker and Stiegler, 1981). Jedoch muss man bedenken, dass dieses Programm lediglich eine Vorhersage über die zweidimensionale Struktur des RcRE leisten kann. Inwieweit die einzelnen „Stem-Loops“ in der dreidimensionalen Struktur miteinander interagieren und ob unter Berücksichtigung dieser Interaktion eine andere RcRE Faltung entstehen würde, kann nicht gesagt werden. Mit Hilfe von RcRE-Konstrukten, die spezifische Mutationen oder gezielte Deletionen trugen, konnte durch *in vivo* Funktionsanalysen gezeigt werden, dass für die Bindung von Rec an sein RcRE ein weitaus größerer Sequenzbereich benötigt wird, als das

bei Rev und Rex der Fall ist. Damit Rev und Rex an ihre jeweiligen responsiven Elemente binden können, wird ein Sequenzbereich von 20-30 Nukleotiden benötigt. Für Rec haben die *in vivo* Funktionsanalysen mit RcRE RNAs, die spezifische Mutationen trugen (Hybrid-RcRE RNAs), ergeben, dass ein Bereich von mehr als 210 Nukleotiden erforderlich ist, damit Rec an sein RcRE binden kann. Bei einem Bereich von 210 Nukleotiden kann ausgeschlossen werden, dass es sich um ein sequenzspezifisches Bindungsmotiv handelt. Auch die Befunde aus den Experimenten mit Deletionsmutanten bekräftigen diese Vermutung. Es hat sich gezeigt, dass durch die Deletion von mindestens einem von vier verschiedenen „Stem-Loops“ der Aufbau eines aktiven Exportkomplexes verhindert wird. Würde, wie bei Rev und Rex, die Bindung von Rec an das RcRE über ein sequenzspezifisches Motiv in einer einzelnen „Stem-Loop“ Struktur erfolgen, hätte lediglich die Deletion dieses spezifischen „Stem-Loops“ zum Verlust eines aktiven Exportkomplexes führen dürfen.

Mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vitro* RNA-Bindungsstudien sollte bestätigt werden, dass der *in vivo* festgestellte Funktionsverlust der RcRE RNAs auf den Verlust der Rec-Bindung zurückzuführen ist. Für die Hybrid-RcRE RNAs konnte dies bestätigt werden, nur für die aktiv getesteten Hybrid-RcRE RNAs konnte *in vitro* eine Rec-Bindung gezeigt werden. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da für die inaktiven RcRE RNAs computergestützt eine Sekundärstruktur vorhergesagt wurde, die sich deutlich von der Struktur der biologisch aktiven RcRE RNA unterscheidet. Bei der Analyse des Rec-Bindevermögens der RcRE RNAs mit Deletionen zeigte sich hingegen, dass die Deletion eines einzelnen „Stem-Loops“ *in vitro* nicht zum Verlust der Rec-Bindung führt. Die Tatsache, dass die Deletion einer dieser essentiellen „Stem-Loop“ Strukturen alleine nicht zum Verlust der Bindung von Rec führt, legt nahe, dass Rec über mehrere Kontaktpunkte an das RcRE bindet. Der Verlust eines Kontaktpunktes induziert zwar nicht den Verlust der Rec-Bindung, allerdings führt die Protein-RNA Interaktion nicht zum Aufbau eines aktiven Exportkomplexes. Es ist denkbar, dass für den Aufbau eines stabilen Rec/RcRE-Komplexes mehrere Rec-Moleküle an die RcRE RNA binden müssen. Möglicherweise fehlen bei den inaktiven Deletions-RcRE RNAs Kontaktpunkte, die für die Bindung von weiteren Rec-Molekülen benötigt werden. Deshalb wäre es interessant zu untersuchen, ob man in RNA-Protein Bindungsstudien bei Titration von Rec mit den inaktiven Deletions-RcRE RNAs ein anderes Retardierungsmuster erhält, als mit der aktiven RcRE RNA.

Die Untersuchungen zur Charakterisierung des Rec-Proteins, besonders seiner RNA-Bindedomäne, auf die in Abschnitt 3.2.4. näher eingegangen wird, unterstützen die Hypothese, dass die richtige Faltung von RcRE und Rec-Protein ausschlaggebend für eine Bindung sind. Des Weiteren legen sie die Vermutung nahe, dass es einen Zusammenhang zwischen Multimerisierung (Dimerisierung oder Tetramerisierung) und RcRE-Bindung geben könnte.

Zusammenfassend haben die Untersuchungen zum RcRE ergeben, dass sich die Rec/RcRE-Bindung deutlich von der Rev/RRE und Rex/RxRE Bindung unterscheidet. Während bei Rev und Rex die Bindung an die responsiven Elemente über spezifische Sequenzmotive in einer „Stem-Loop“-Struktur erfolgt, bindet Rec über eine komplexe, gefaltete RNA-Struktur an das RcRE; mehrere „Stem-Loop“-Strukturen tragen zum Aufbau eines funktionalen Komplexes bei.

3.2 Crm1 ist am Rec abhängigen RNA Export beteiligt

Zelluläre mRNA Transkripte werden nach Beendigung des Spleißprozesses in der Regel über den Exportrezeptor TAP ins Zytoplasma transportiert. Auch bei einfach strukturierten Retroviren erfolgt der Transport der Vollängen oder einfach gespleißten RNA über diesen Exportrezeptor. Aus der Literatur ist bekannt, dass TAP direkt an die RNA bindet und nicht mit RNA-Adaptor-Proteinen interagiert (Braun et al., 1999; Grüter et al., 1998; Kang et al., 1999; Kang and Cullen, 1999). Da bei den komplexen Retroviren der Export der ungespleißten und unvollständig gespleißten viralen Transkripte über kleine RNA-Adaptoren vermittelt wird, kommt TAP als Exportrezeptor nicht in Frage. Es sollte daher untersucht werden, über welchen zellulären Exportrezeptor der Rec-abhängige RNA-Export erfolgt.

Bei HIV/Rev und HTLV/Rex konnte Crm1 als Exportrezeptor identifiziert werden. Crm1 ist ein Mitglied der Importin β Familie. In Gegenwart von RanGTP bindet Crm1 an das nukleäre Exportsignal (NES) von Rev, eine leucinreiche Domäne, und transportiert den tetrameren Komplex, bestehend aus Rev, dem viralen Transkript, RanGTP und Crm1 durch die Nukleopore ins Zytoplasma. Aufgrund der vergleichbaren Funktion von Rec, Rev und Rex lag die Vermutung nahe, dass Crm1 auch der Exportrezeptor von Rec ist. In einer früheren Publikation konnte C. Magin zeigen, dass der Rec-abhängige RNA-Export durch Zugabe von Leptomycin B blockiert werden kann (Magin et al., 2000). Leptomycin

B bindet über das Cystein an Position 529 kovalent an Crm1 und inhibiert dadurch das Protein. Aufgrund seiner direkten Interaktion mit Crm1 gilt Leptomycin B als Crm1 spezifischer Inhibitor. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Leptomycin B auch auf andere Crm1 verwandte Exportrezeptoren eine inhibierende Wirkung hat.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Konkurrenzexperimente mit „Pendel“-Proteinen, die das NES von Rev oder Rex tragen (CFNrev, CFNrex), bestätigen eine Beteiligung von Crm1 am Rec-abhängigen RNA-Export. In Gegenwart von CFNrev und CFNrex konnte der Rec-abhängige RNA-Export vollständig blockiert werden; was nur durch Konkurrenz um Crm1 zu erklären ist.

In einem „umgekehrten“ Experiment wurde ein „Pendel“-Protein (CFNrec) verwendet, das die Sequenz stromabwärts vom Rec NLS trägt und in der das Exportsignal lokalisiert sein sollte. Mit diesem Protein konnte weder der Rev-abhängige noch der Rex-abhängige RNA-Export blockiert werden. Hingegen konnte mit CFNrev der Rex-abhängige und mit CFNrex der Rev-abhängige RNA-Export vollständig blockiert werden. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Konkurrenzfähigkeit von CFNrec ist, dass durch die Deletion des N-terminalen Bereiches von Rec und Fusion an das NLS von SV40 ein nicht funktionales CFNrec-Protein entstanden ist, das nicht mehr mit Crm1 interagieren kann. Bereits in mehreren zuvor durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass ein N-terminaler Fusionsanteil die Funktion von Rec stört (unveröffentlichte Daten).

In „self-competition“ Experimenten zeigte sich, dass die Proteine CFNrev und CFNrex jeweils den eigenen Exportweg vollständig blockieren können. Mit CFNrec war dies nicht möglich. Der Rec-abhängige RNA-Export konnte mit CFNrec nur um 40% inhibiert werden. Diese Inhibition des Rec-abhängigen RNA-Exportes ist wahrscheinlich auf die Ausbildung von inaktiven Heteromultimeren zwischen Rec und CFNrec zurückzuführen. In *in vivo* Multimerisierungsstudien konnte gezeigt werden, dass CFNrec Heterodimere mit Rec-NLSmut-GFP ausbilden kann (Abschnitt 2.3.1).

Den biochemischen Nachweis, dass es sich bei Crm1 um den Exportrezeptor von Rec handelt, lieferten die in dieser Arbeit durchgeführten Ko-Immunpräzipitationen. Es ist uns erstmals gelungen, eine direkte Interaktion zwischen Crm1 und Rec zu zeigen. Wie bei Rev konnte diese nur in Gegenwart von RanGTP gezeigt werden (Fornerod et al., 1997; Fukuda et al., 1997; Ossareh-Nazari et al., 1997). Askjaer et al. konnten zeigen, dass durch RanGTP die Affinität von Crm1 zu Rev erhöht wird. Welche Funktion RanGTP ausübt, ist nicht eindeutig geklärt. Eine Modellvorstellung ist, dass RanGTP sowohl an Crm1 als auch

an die NES Sequenz bindet und dadurch den Komplex stabilisiert, jedoch gibt es keine Hinweise darauf, dass RanGTP mit den NES-Sequenzen interagiert. Eine zweite Modellvorstellung besagt, dass durch die Bindung von RanGTP an Crm1 eine Konformationsänderung bei Crm1 bewirkt wird, durch die die Affinität von Crm1 zu den NES-Sequenzen erhöht wird. Die Daten von Askjaer unterstützen dieses zweite Modell (Askjaer et al., 1998).

3.3 Einfluss von N- und C-terminalen Fusionsanteilen auf die Funktionalität von Rec

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Anhängen von N- oder C-terminalen Fusionsanteilen kritisch für die Funktion von Rec und Rec-Mutanten sein kann.

Bereits Vorarbeiten, die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, haben ergeben, dass ein N-terminaler GFP-Fusionsanteil nahezu zum vollständigen Funktionsverlust von Rec führt (Hesse, 1998). Eine C-terminale GFP-Markierung hatte hingegen nur einen minimalen Einfluss auf die Funktion von Rec-wt.

Die Untersuchungen, die im Zuge der Charakterisierung der funktionalen Domänen von Rec durchgeführt wurden, haben gezeigt, dass auch ein C-terminaler GFP-Fusionsanteil im Zusammenspiel mit bestimmten Mutationen zum Funktionsverlust von Rec führen kann. So konnten wir für zwei Rec-Mutanten (Rec-LRD1mutIII, Rec-LRD2mutIII), bei denen jeweils ein Leucin-Rest gegen Alanin ausgetauscht wurde, zeigen, dass die Mutation per se zu keinem Funktionsverlust führt, dass aber durch die Fusion an GFP die Funktionalität des Proteins verloren geht (siehe 2.3.3, Abb. 2.12 A und siehe 2.3.5, Abb. 2.14. A). Dieser Funktionsverlust ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass durch die Mutation faltungssensitive Rec-Mutanten entstanden sind und der GFP-Fusionsanteil im Zusammenspiel mit der Mutation zu einer veränderten Proteinstruktur geführt hat, die für den Funktionsverlust verantwortlich ist.

Diese Ergebnisse sind von großem Interesse, da in Publikationen für die Charakterisierung funktionaler Domänen von Rec häufig Rec und Rec-Mutanten verwendet wurden, die einen C- oder N-terminalen Fusionsanteil tragen (Boese et al., 2001; Boese et al., 2000; Bogerd et al., 2000b). Aufgrund der in unserer Arbeitsgruppe erzielten Ergebnisse sind

diese Daten in Frage zu stellen. Im Verlauf der Diskussion soll an entsprechender Stelle auf die einzelnen Ergebnisse näher eingegangen werden.

3.4 Bestimmung des NES, detaillierte Untersuchung der Funktion der ersten und zweiten leucinreichen Domäne

3.4.1 Sequenzvergleich der leucinreichen Domänen von Rec mit leucinreichen Domänen anderer viraler und zellulärer Proteine

Wie bereits erwähnt, bindet der Exportrezeptor Crm1 in der Regel an leucinreiche Sequenzmotive seines „Exportcargos“. Bogerd et al. konnten anhand von *in vivo* durchgeführten Funktionsanalysen mit Rex eine Konsensussequenz für ein funktionales leucinreiches NES ableiten (Bogerd et al., 1996; Bogerd et al., 1995).

HIV-1 Rev	L P P · L E R · L T L
HTLV1 Rex	L S A Q L Y S S L S L
Visna Rev	M V G · M E N · L T L
SIV _{agm} Rev	L A D E A Q H · L A I
RanBP1	V A E K L E A · L S V
PKI	L A L K L A G · L D I
HERV-K LRD1	W A Q · L K K · L T Q L
HERV-K LRD2	E S M L L A A · L M I
Konsensussequenz	L X₂₋₃ L X₂₋₃ L X L/I
FIV Rev	KAFKKMMTDLED RFRK LFGSPSKDEYT
EIAV Rev	GPLESGQWCRVLRQSLPE

Abb 3.1: Vergleich der Aminosäuresequenz verschiedener leucinreicher nukleärer Exportsignale mit der Konsensussequenz, die durch *in vivo* Experimente mit Rex bestimmt wurde. Die NES von Rex/HTLV (Van Brussel et al., 1996), Rev/HIV und Rev/SIV (Hope et al., 1991) zeigen untereinander deutliche Ähnlichkeiten. Aber auch zelluläre Proteine, wie z.B. der Transportfaktor RanBP1 und der Inhibitor der cAMP-abhängigen Protein Kinase (PKI; Nigg, 1997) verfügen über vergleichbare Motive. Bei FIV Rev und EIAV Rev besteht die Crm1-Bindedomäne aus einer polaren Domäne.

Dieses besteht, wie in Abbildung 3.1 dargestellt, aus einer Ansammlung von vier Leucin-Resten oder anderer hydrophober Aminosäuren, wobei die ersten drei Leucin-Reste im Abstand von zwei oder drei Aminosäuren zueinander stehen und das vierte Leucin durch eine Aminosäure von dem dritten Leucin getrennt ist. Daraus resultiert die Konsensussequenz: L x₂₋₃ L x₂₋₃ L x L. leucinreiche NES, wie man sie bei Rex und Rev findet, hat man auch bei zahlreichen anderen viralen und zellulären Proteinen gefunden (Abb. 3.1).

Rec besitzt zwei leucinreiche Domänen. Die erste leucinreiche Domäne (LRD1) erstreckt sich von Aminosäure 50 bis 59 und die zweite leucinreiche Domäne (LRD2) von Aminosäure 77 bis 83. Beide leucinreiche Domänen zeigen Ähnlichkeiten zur Konsensussequenz für leucinreiche NESs. Bei der ersten leucinreichen Domäne (LRD1) ist das erste Leucin durch die hydrophobe Aminosäure Tryptophan ersetzt, die drei folgenden Leucin-Reste stehen im Abstand von drei Aminosäuren zueinander. Damit weicht die Position des letzten Leucins von der Position des entsprechenden Leucins der Konsensussequenz ab (Abb. 3.1). Dadurch entsteht zwischen dem dritten und vierten Leucin ein ungewöhnlicher Abstand. Auch die zweite leucinreiche Domäne von Rec zeigt Abweichungen von der Konsensussequenz. Bei LRD2 folgen die ersten beiden Leucin-Reste unmittelbar aufeinander, das dritte und vierte Leucin bzw. Isoleucin befindet sich aber wiederum an einer Position, die mit der Konsensussequenz übereinstimmt.

Wie aus Abbildung 3.1 hervorgeht, gibt es kein striktes Sequenzmotiv für leucinreiche NES, so dass beide leucinreiche Domänen von Rec als putative Exportsignale in Frage kommen. Bei den Nicht-Primaten-Lentiviren FIV und EIAV konnte gezeigt werden, dass Crml auch über polare Effektordomänen (Abb. 3.1) an die Export-Adaptor-Proteine binden kann (Mancuso et al., 1994), eine polare Domäne ist bei Rec nicht zu finden.

3.4.2 Das nukleäre Exportsignal ist im Bereich der zweiten leucinreichen Domäne lokalisiert

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine der beiden leucinreichen Domänen als NES von Rec fungiert.

Durch Mutation relevanter hydrophober Aminosäuren der ersten (LRD1mut, AS 50-59) oder zweiten leucinreichen Domäne (LRD2mut, AS 77-83) und anschließender Immunfluoreszenzanalyse der subzellulären Lokalisation dieser Rec-Mutanten konnte

gezeigt werden, dass das NES im Bereich der zweiten leucinreichen Domäne lokalisiert ist. Rec-LRD2mut war ausschließlich in den Nukleoli und im Zellkern lokalisiert. Das Protein wurde nicht ins Zytoplasma exportiert. Dieses Ergebnis wird durch die Beobachtung gestützt, dass RecB, eine natürliche Spleißvariante von Rec, die eine Deletion im Bereich von Aminosäure 69 bis 87 trägt, die gleiche Lokalisation zeigt, wie Rec-LRD2mut (unveröffentlichte Daten aus der Arbeitsgruppe). Rec-LRD1mut hingegen war auch im Zytoplasma nachweisbar.

Mit diesen Untersuchungen konnte erstmals gezeigt werden, dass das NES von Rec im Bereich der zweiten leucinreichen Domäne lokalisiert ist und sich nicht, wie in der Literatur beschrieben, im Bereich der ersten leucinreichen Domäne befindet (Boese et al., 2000).

Bei Boese et al. erfolgte die Identifizierung des NES ebenfalls über Lokalisationsstudien (Boese et al., 2000). Dazu wurde jedoch GFP N-terminal an Rec-wt und Rec-LRD1mut (Rec-NESmut) fusioniert. Die Analysen ergaben, dass GFP-Rec-wt in den Nukleoli und im Zytoplasma lokalisiert war, während die Mutante GFP-Rec-LRD1mut eine nukleoläre und nukleäre Lokalisation gezeigt hat. Lokalisationsstudien, die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, haben hingegen eindeutig gezeigt, dass GFP-Rec-wt im Vergleich zu Rec-wt verstärkt im Zellkern lokalisiert ist (Hesse, 1998). Aufgrund dieses Ergebnisses und der Tatsache, dass wir eindeutig zeigen konnten, dass der GFP-Fusionsanteil zu einer veränderten Lokalisation von Rec-LRD1mut führt, ist davon auszugehen, dass die von Boese et al. beschriebene nukleäre Lokalisation von Rec-LRD1mut auf den N-terminalen GFP-Fusionsanteil zurückzuführen ist.

Die zweite leucinreiche Domäne (77-LLAALMI-83) zeigt, mit Ausnahme der Position des ersten Leucin-Restes, große Ähnlichkeit zur NES Konsensussequenz (LX₂₋₃LX₂₋₃LXLI). Dennoch ist die Bedeutung dieser Domäne als NES schwierig einzuschätzen. Für Rev konnte gezeigt werden, dass der Austausch des zweiten, dritten oder vierten Leucin-Restes gegen Alanin ausreicht, um die Bindung an Crm1 zu zerstören (Malim et al., 1991). Bei Rec hat die Untersuchung der Punktmutanten, bei denen ebenfalls jeweils ein Leucin-Rest gegen Alanin ausgetauscht wurde, ergeben, dass keine der Punktmutationen zum Verlust der Exportrezeptorbindung führt. Alle Rec-LRD Punktmutanten konnten noch- wenn auch eingeschränkt- zwischen Kern und Zytoplasma pendeln. Auch die Crm1-Bindungsstudien haben gezeigt, dass alle Rec-LRD Punktmutanten an Crm1 binden können. Dies könnte bedeuten, dass das Rec NES eine höhere Affinität zu Crm1 besitzt, als dies bei Rev der Fall ist und deswegen der Austausch eines einzelnen Leucin-Restes gegen Alanin bei Rec

zu einer Abschwächung und nicht, wie bei Rev, zu einem Verlust der Crm1-Bindung führt. Zur Charakterisierung des Rex NES wurden ebenfalls Punktmutanten hergestellt (Bogerd et al., 1996). Dabei wurden die relevanten Leucin-Reste nicht gegen hydrophobe Alanin-Reste, sondern gegen ungeladene Glycin- oder basische Lysin-Reste ausgetauscht. Der Austausch eines einzelnen Leucin-Restes gegen Glycin oder Lysin führte bei Rex zum Verlust der Crm1 Bindung. Es wäre interessant zu untersuchen, ob bei Rec der Austausch eines Leucin-Restes gegen Glycin oder Lysin zum Verlust der Exportrezeptorbindung führt. Sollte dies der Fall sein, so wäre es ein Hinweis dafür, dass die Leucin-Reste an der Ausbildung des Rec NES beteiligt sind.

Eine zweite mögliche Interpretation der Ergebnisse ist, dass die Leucin-Reste nicht als Bindungsmotiv fungieren, sondern für die richtige Konformation des Proteins sorgen. Es ist außerdem denkbar, dass neben den Leucin-Resten noch weitere Aminosäuren im Bereich der zweiten leucinreichen Domäne an der Ausbildung des Rec NES beteiligt sind. Auffällig ist, dass der Bereich von Aminosäure 76 bis 91 zu 81% aus hydrophoben Aminosäuren besteht. Im Zuge der Bestimmung einer Konsensussequenz für leucinreiche NES konnte gezeigt werden, dass die Funktion der Leucin-Reste auch durch andere Aminosäuren mit stark hydrophoben Seitenketten ersetzt werden kann. Wichtig ist, dass die hydrophoben Aminosäuren in einem bestimmten Abstand zueinander stehen. So konnte die Sequenz **FSRSEFNAILHVS**, die mit Ausnahme eines Leucin-Restes an den relevanten Positionen Phenylalanin- oder Valin-Reste trägt, die Funktion des Rex NES ersetzen (Bogerd et al., 1996). Bei Rec findet man im Bereich von Aminosäure 76 bis 91 vier Sequenzmotive, die als potentielle Exportsignale in Frage kommen könnten (76-**MLLAALMIV**-84, 76-**MLLAALMIVSM**-86, 76-**MLLAALMIVSM**-86 und 83-**IVSMVSA**GV-91). Aufgrund von Daten aus Vorarbeiten mit verschiedenen Rec-Mutanten kann das letzte Sequenzmotiv (AS 83-91) als NES weitgehend ausgeschlossen werden. Es konnte gezeigt werden, dass der Bereich ab Aminosäure 87 keinen Einfluss auf die Lokalisation und Funktion des Rec-Proteins hat (unveröffentlichte Daten). Es wäre interessant zu untersuchen, ob Rec-Mutanten, die Mutationen im Bereich der weiteren potentiellen NES-Sequenzen tragen, das Bild von Exportmutanten zeigen.

Bogerd et al. haben sich ebenfalls mit der Charakterisierung funktionaler Domänen bei Rec beschäftigt (Bogerd et al., 2000a). Genau wie in der hier präsentierten Dissertation wurden durch Mutationsanalysen funktionale Domänen von Rec identifiziert. Dazu wurden die in Abbildung 3.3 dargestellten Mutationen eingeführt (K1-K14). Einige der Mutanten tragen

Mutationen im Bereich der ersten (K7, K8, K9) oder zweiten (K11, K12) leucinreichen Domäne. Auf die Ergebnisse, die mit diesen Mutanten erzielt wurden, soll im Folgenden näher eingegangen werden.

Ein direkter Vergleich der Ergebnisse ist nicht möglich, da die von uns hergestellten Mutanten Punktmutationen tragen, während bei den von Bogerd verwendeten Mutanten jeweils drei hintereinander liegende Aminosäuren mutiert wurden. Jedoch ist es möglich, die Schlussfolgerungen, die aus den Experimenten gezogen wurden, miteinander zu vergleichen.

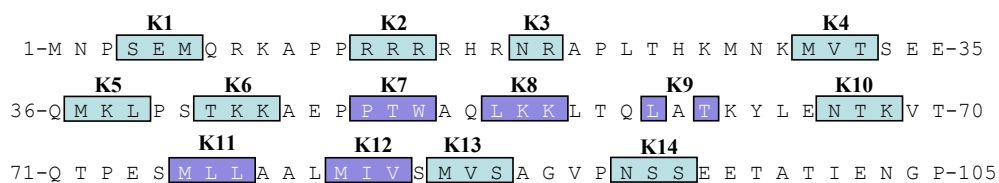


Abb. 3.3: Aminosäuresequenz von Rec. Die farbigen Boxen kennzeichnen die Aminosäuren, die mutiert wurden. Dabei wurden die Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht (Bogerd et al., 2000b). Die Mutanten, die Mutationen im Bereich der leucinreichen Domänen tragen, sind anders farbig unterlegt.

Die Charakterisierung des NES erfolgte bei Bogerd et al. über Lokalisations- und Crm1-Bindungsstudien. Das Crm1-Bindevermögen der Rec-Mutanten wurde über „Hefe-Zwei-Hybrid“-Studien bestimmt. Die Immunfluoreszenzanalysen ergaben, dass K7 und K12 das visuelle Bild von Exportmutanten zeigen. Beide Proteine akkumulierten im Zellkern. K8 und K9 verhielten sich wie der Wildtyp und K11 zeigte den Phänotyp einer Importmutante. Die Crm1-Bindungsstudien ergaben, dass K12 genauso gut an Crm1 binden kann wie K9, das über Crm1 ins Zytoplasma transportiert wird. K8 hingegen zeigte eine drastisch eingeschränkte Crm1-Bindung (ca. 8%), obwohl in der Immunfluoreszenzanalyse gezeigt werden konnte, dass das Protein Crm1-vermittelt den Kern verlässt. Nur für K7 hat man ein einheitliches Bild erhalten. Diese Mutante hat sich sowohl in den Lokalisationsstudien als auch in den Crm1-Bindungsstudien wie eine Exportmutante verhalten. Jedoch ist zu beachten, dass bei K7 ein Prolin gegen Alanin ausgetauscht wurde. Für Prolin ist bekannt, dass diese Aminosäure „Helix-Brüche“ verursacht. Es ist daher denkbar, dass durch den Austausch des Prolins gegen Alanin eine veränderte Sekundärstruktur entstanden ist, und das der Funktionsverlust auf diese

veränderte Konformation und nicht auf die Zerstörung des Exportsignals zurückzuführen ist.

Obwohl nur K7 das Bild einer Exportmutante gezeigt hat- K8 und K9 können noch Crm1- vermittelt den Kern verlassen- halten die Autoren der Publikation es für möglich, dass es sich bei der ersten leucinreichen Domäne um das NES handeln könnte. Dass auch K12 das visuelle Bild einer Exportmutante zeigt, bleibt unberücksichtigt. Die von uns erzielten Ergebnisse zeigen hingegen eindeutig, dass das NES von Rec im Bereich der zweiten leucinreichen Domäne lokalisiert ist.

Generell ist eine Beurteilung der von Bogerd et al. erzielten Ergebnisse schwierig, da für die „Hefe-Zwei-Hybrid“-Studien immer Rec und Rec-Mutanten mit C- oder N-terminalen Fusionsanteil verwendet wurden und nicht ausgeschlossen werden kann, dass der Fusionsanteil einen Einfluss auf die Funktion einiger Rec-Mutanten hat. Des Weiteren wird in der Publikation für Rec-wt eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation beschrieben. Wir sehen aber in der Regel eine überwiegend nukleoläre Lokalisation. Eine vergleichbare Lokalisation zeigt Rec auch in GH-Zellen, wo es natürlicherweise exprimiert wird.

Für Rev, Rex und andere virale und zelluläre Proteine mit leucinreichen NES konnte in Funktionsanalysen festgestellt werden, dass die Exportsignale gegeneinander austauschbar sind, ohne dass ihre Funktion verloren geht. Für die Funktionsanalysen wurden chimäre Proteine hergestellt, die aus einer Rev-Sequenz mit mutiertem oder deletiertem Exportsignal und der zu untersuchenden Protein-Sequenz mit NES Motiv bestanden. Mit diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Funktion des Rev NES von zahlreichen NES anderer viraler und zellulärer Proteine übernommen werden kann (McDonald et al., 1992; Venkatesan et al., 1992). Auch die polaren Effektordomänen von EIAV und FIV (Abb. 3.1) konnten die Funktion des Rev NES ersetzen (Mancuso et al., 1994). Das Rec NES konnte in dem oben beschriebenen chimären Konstrukt die Funktion des Rev NES nicht übernehmen (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe). Offenbar scheint das NES von Rec nur im Rahmen der Rec-Struktur funktional zu sein. Diese Vermutung wird durch die Befunde mit CFNrec unterstützt, die nahe legen, dass CFNrec, das sich aus dem NLS von SV40 und der Sequenz stromabwärts vom Rec NLS, die das NES beinhalten sollte, zusammensetzt, nicht an Crm1 binden kann (Siehe 2.2.1, Abb. 2.7).

Bei Rev besteht aufgrund der geringen Affinität von Crm1 zu Rev die Hypothese, dass für einen effizienten Export von Rev ein zusätzlicher, die Crm1-Bindung stabilisierender Faktor benötigt wird. Ein möglicher Kandidat ist der Translationsfaktor eIF-5A. Es gibt jedoch sowohl Ergebnisse, die für als auch gegen eIF-5A als Brückenprotein sprechen (Elfang et al., 1999; Henderson and Percipalle, 1997). Auch für Rec kann nicht ausgeschlossen werden, dass für eine stabile Exportrezeptorbindung ein zusätzlicher Faktor benötigt wird. Für Rec wäre es interessant zu untersuchen, ob man neben Crm1 noch weitere Faktoren identifizieren kann, die direkt mit Rec interagieren. Als mögliche Methoden sind zu nennen: Ko-Immunpräzipitation oder „Hefe-Zwei-Hybrid“-Analysen.

3.4.3 Multimerisierung bei Rec

Im Folgenden wird der Begriff Multimerisierung als Überbegriff für Protein-Protein-Interaktionen verwendet.

Für Rev konnte in zahlreichen Funktionsstudien mit multimerisierungsdefizienten Rev-Mutanten gezeigt werden, dass Multimerisierung für die Funktion des Proteins erforderlich ist (Madore et al., 1994; Malim and Cullen, 1991; Olsen et al., 1990; Zapp et al., 1991). Bei Rev besteht die Multimerisierungsdomäne aus zwei separaten Regionen, die sich von Aminosäure 18-32 und 47-60 erstrecken und durch die argininreiche Domäne (NLS) getrennt sind (Auer et al., 1994; Thomas et al., 1997; Thomas et al., 1998). Auch für Rex hat die Kombination von verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Daten ergeben, dass Multimerisierung für die biologische Aktivität des Proteins von Bedeutung ist (Askjaer and Kjems, 1998; Ballaun et al., 1991; Bogerd et al., 1991; Grone et al., 1994; Unge et al., 1991). Die Multimerisierungsdomäne von Rex ist nicht ganz so gut untersucht. Aber auch hier hat man experimentell zwei Regionen definieren können, die an der Ausbildung von Rex-Homomultimeren beteiligt sind. Die erste Region erstreckt sich von Aminosäure 57 bis 66 und die zweite von Aminosäure 106 bis 124 (Heger et al., 1998). Damit schließt die Multimerisierungsdomäne das NES (AS 82 bis 94) mit ein.

Computergestützte Strukturanalysen haben ergeben, dass auch Rec eine putative Multimerisierungsdomäne besitzt, die aus einem „Helix-Loop-Helix“-Motiv besteht. Die erste Helix umfasst die Aminosäuren 22 bis 39, der „Loop“ besteht aus den Aminosäuren 40 bis 48 und die zweite Helix setzt sich aus den Aminosäuren 49-66 zusammen und schließt damit die erste leucinreiche Domäne (AS 50-59) mit ein (Löwer et al., 1995).

Dass Rec multimerisieren kann, konnte sowohl mit Hilfe eines *in vivo* Multimerisierungsassays (siehe 2.3.3), als auch *in vitro* über Kreuzvernetzung mit Glutaraldehyd gezeigt werden (unveröffentlichte Daten). Es ist jedoch fraglich, ob es sich bei dem „Helix-Loop-Helix“ Motiv tatsächlich um die Multimerisierungsdomäne handelt. Boese et al. konnten zeigen, dass der Bereich von Aminosäure 47-87 vorhanden sein muss, damit Rec dimerisieren kann (Boese et al., 2001). Dieser Bereich umfasst sowohl die erste (AS 50-59) als auch die zweite (AS 77-83) leucinreiche Domäne. Auch unsere Daten legen nahe, dass die zweite leucinreiche Domäne einen Einfluss auf die Multimerisierung hat. In Vorarbeiten konnte mit Hilfe des in Abschnitt 2.3.3 beschriebenen *in vivo* Multimerisierungsassays festgestellt werden, dass sowohl Rec-LRD1mut als auch Rec-LRD2mut nicht mehr multimerisieren können. Für Rec-LRD1mut war dieses Ergebnis zu erwarten, da die Mutation der ersten leucinreichen Domäne auch gleichzeitig eine Mutation der putativen Multimerisierungsdomäne bedeutet. Dass sich auch die Mutation der zweiten leucinreichen Domäne auf die Multimerisierungsfähigkeit von Rec auswirkt, kann unterschiedliche Gründe haben. Eine Möglichkeit ist, dass die zweite leucinreiche Domäne an der Ausbildung der Multimerisierungsdomäne beteiligt ist und das „Helix-Loop-Helix“ Motiv nicht von Bedeutung ist. Aufgrund der bisherigen Daten kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die zweite leucinreiche Domäne nur einen indirekten Effekt auf die Multimerisierungsdomäne ausübt, indem sie eine Proteinkonformation erzeugt, die eine Multimerisierung im Bereich des „Helix-Loop-Helix“ Motivs verhindert.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte detaillierter untersucht werden, ob bestimmte Aminosäuren im Bereich der leucinreichen Domänen an der Ausbildung von Multimeren beteiligt sind. Ferner sollte analysiert werden, ob Multimerisierung für die Funktion von Rec essentiell ist.

Die Untersuchung des Multimerisierungsvermögens der Rec-LRD Punktmutanten erfolgte mit dem in Abschnitt 2.3.3 beschriebenen *in vivo* Multimerisierungsassay. Dabei zeigte sich, dass alle Rec-LRD Punktmutanten in der Lage sind, Dimere mit Rec-NLSmut-GFP auszubilden. Der Nachteil des verwendeten Testsystems ist, dass man in diesem System nur die Heterodimerisierung der Rec-LRD Punktmutanten mit Rec-NLSmut-GFP überprüfen kann. Mit diesem Testsystem kann nicht gezeigt werden, ob die Rec-LRD Punktmutanten Homodimere ausbilden können. Eine Möglichkeit zur Überprüfung der Homodimerisierung der Rec-LRD Punktmutanten wäre, die Mutanten mit unterschiedlichen Fusionsanteilen zu versehen und über Immunpräzipitation zu

analysieren, ob man mit einem Antikörper, der nur gegen eine Markierung gerichtet ist, beide Fusionsproteine präzipitieren kann. Zuvor müsste überprüft werden, ob die Fusionsanteile einen Einfluss auf die Funktion der Rec-Mutanten ausüben.

Ein Hinweis darauf, dass das Multimerisierungsvermögen einiger Rec-LRD Punktmutanten beeinträchtigt sein könnte, lieferten die RNA-Protein-Bindungsstudien, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden. Bei Verwendung einer erhöhten Menge an gereinigtem rekombinanten Protein wurde mit dem Wildtyp-Protein ein Retardierungsmuster beobachtet, das sich aus zwei Banden unterschiedlicher Mobilität zusammensetzte (siehe 2.1.9, Abb. 2.21). Interessanterweise wird dieses Retardierungsmuster bei Verwendung gleicher Proteinmengen nur mit den funktionalen Proteinen Rec-LRD1mutIV (L59A), Rec-LRD2mutIII (L81A) und Rec-LRD2mutIV (L83A) erzielt. Mit den übrigen Mutanten wurde mit gleichen Proteinmengen nur eine Bande verringerter Mobilität erhalten, wobei die Höhe dieser Bande mit der Höhe der weniger stark retardierten Bande bei Rec-wt übereinstimmte (siehe 2.1.9, Abb. 2.21). Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass sich hinter der stark retardierten Bande ein funktionales Rec-Multimer verbirgt. Ob dieses Multimer aus einem Dimer oder Tetramer besteht, lässt sich anhand des Retardierungsmusters nicht erkennen. Sollte sich hinter der stark retardierten Bande tatsächlich ein funktionales Rec-Multimer verbergen, so könnte dies bedeuten, dass die Mutanten Rec-LRD1mutI (W50A) und II (L53A) sowie Rec-LRD2mutI (L77A) und II (L78A) nicht auf der RcRE-RNA multimerisieren.

Interessanterweise lässt sich eine Korrelation zwischen RNA-Bindung und möglicher Multimerisierung feststellen. Die stärker retardierte Bande erhält man nur mit Rec-Mutanten, die noch genauso effizient an die RcRE-RNA binden können, wie der Wildtyp (siehe 2.1.9, Abb. 2.20). Dies legt die Vermutung nahe, dass Multimerisierung für den Aufbau eines stabilen Rec/RcRE-Komplexes benötigt wird. Dabei ist es denkbar, dass mehrere Rec-Moleküle an die RcRE RNA binden und über die Multimerisierung dieser Rec-Moleküle die Bindung an die RNA stabilisiert wird. Auch die Daten aus der Untersuchung des RcRE deuten darauf hin, dass mehr als ein Rec-Molekül an die RcRE-RNA bindet (siehe 3.1).

Für das Fehlen der stärker retardierten Bande bei Verwendung von Rec-LRD1mutI und II sowie Rec-LRD2mutI und II gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten. Eine Möglichkeit wäre, dass die Mutanten eine Konformation besitzen, die verhindert, dass mehrere Rec-Moleküle an die RcRE-RNA binden und man deswegen keine stärker retardierte

Bande erhält. Eine andere Möglichkeit wäre, dass diese Mutanten nicht mehr multimerisieren können.

Bei Bogerd und Mitarbeitern haben die Untersuchungen zur Multimerisierung ebenfalls ergeben, dass beide leucinreichen Domänen für die Multimerisierung von Bedeutung sind. Den Verlust der Multimerisierung bei K7 führen Bogerd et al. jedoch auf die fehlende Crm1-Bindung zurück. Diese Hypothese stützt sich auf Untersuchungen, die bei Rev durchgeführt wurden und mit denen gezeigt werden konnte, dass bei Rev die Crm1-Bindung einen positiven Effekt auf die Multimerisierung hat (Bogerd et al., 1998; Hakata et al., 1998; Madore et al., 1994). Unsere RNA-Protein-Bindungsstudien, die in Abwesenheit von Crm1 durchgeführt wurden, deuten jedoch darauf hin, dass Crm1 Bindung nicht zwingend für die Multimerisierung ist und Rec auch in Abwesenheit von Crm1 Multimere ausbilden kann. Generell bleibt zu beachten, dass Bogerd und Mitarbeiter ein Testsystem verwendet haben, das nur die Heteromultimerisierung der Rec-Mutanten mit Rec-wt überprüft.

Für Rev und Rex konnte gezeigt werden, dass die Proteine als Oligomere an die RNA binden. Bei Rev multimerisieren mehr als acht Moleküle auf dem RRE, wobei die Primärbindung von Rev über ein sequenzspezifisches Motiv erfolgt. Auch wenn zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht genau untersucht wurde, aus wie vielen Rec-Molekülen ein aktiver Export-Komplex besteht, so kann aufgrund folgender Befunde die Bildung von höhermolekularen Komplexen, die aus mehr als zwei aber maximal vier Rec-Molekülen bestehen, nahezu ausgeschlossen werden:

1. Untersuchungen zum Transdominanzverhalten nicht funktionaler Rec-Mutanten haben gezeigt, dass ein zweifacher Überschuss an mutiertem Rec-Protein ausreichend ist, um die Funktion von Rec-wt um 50% zu reduzieren, ein 3-4facher Überschuss blockierte die Funktion völlig (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe).
2. Aus den RNA-Protein-Bindungsstudien geht hervor, dass auch bei steigender Menge an gereinigtem Rec-Protein im Gel nie mehr als zwei Banden unterschiedlicher Mobilität erhalten werden. Beide Ergebnisse legen nahe, dass Rec wahrscheinlich als Dimer, höchstens als Tetramer auf der RcRE RNA vorliegt.

Die im Rahmen dieser Dissertation erzielten Ergebnisse deuten daraufhin, dass Multimerisierung für die Exportfunktion von Rec von Bedeutung ist. Es gibt aber auch Proteine, bei denen Multimerisierung zur nukleären Retention über Maskierung des NES führt. Das Tumorsuppressorprotein p53 ist solch ein Protein. In der nukleären tetrameren

Form ist das NES maskiert. Ubiquitinilierung führt zur Demaskierung und nachfolgendem Transport der Monomere oder Dimere ins Zytoplasma, wo sie durch Proteasomen degradiert wird (Gottifredi and Prives, 2001). Die Tetramerisierung von p53 wird über Phosphorylierung spezifischer Serin-Reste reguliert (Serin 392) (Sakaguchi et al., 1997).

Auch bei Rex tragen mehrere Serinreste eine Phosphatgruppe, von besonderer Bedeutung scheinen dabei die Serin-Reste an Position 151 und 153 zu sein. Es gibt Hinweise darauf, dass die Phosphorylierung dieser Serin-Reste einen positiven Einfluss auf die RNA-Bindung und den nukleo-zytoplasmatischen Transport von Rex hat (Narayan 2003). Auch Rev ist ein Phosphoprotein. Die Bedeutung der Phosphorylierung ist aber bisher nicht bekannt. In transfizierten Zellen hatte die Zerstörung der Phosphorylierungsstellen (Serin an Position 92 und 99) keine Auswirkung auf die Funktion von Rev (Cochrane et al., 1989; Malim et al., 1989). Möglicherweise ist die Phosphorylierung oder Dephosphorylierung für die Aktivität des Proteins von Bedeutung, wenn Rev in geringer oder limitierender Konzentration in der Zelle vorliegt.

Bei Rec findet man mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen (Serin an Position 33, 41, 94 und 95, Threonin an Position 24, 42, 67 und 72 und ein Tyrosin an Position 63), die mit einer Wahrscheinlichkeit von 54-99% phosphoryliert vorliegen könnten (NetPhos2.0). Deshalb wäre es interessant zu untersuchen, ob Phosphorylierung oder Dephosphorylierung einen Einfluss auf die Funktion von Rec hat.

3.4.4 Leucin-Reste im Bereich beider leucinreicher Domänen sind für die Bindung an das RcRE von Bedeutung

Die regulatorischen Proteine Rev und Rex binden über ihre argininreichen Domänen an die entsprechenden viralen Transkripte. Dabei kommt es zu spezifischen Interaktionen zwischen Arginin-Resten der argininreichen Domäne und spezifischen Nukleotiden des RRE oder RxRE. Bei HERV-K haben die Untersuchungen zum RcRE ergeben, dass die Bindung von Rec an das RcRE nicht über ein Sequenzmotiv erfolgt, sondern über eine komplexe, gefaltete RNA Struktur. Damit war zu vermuten, dass die Arginin-Reste der argininreichen Domäne nicht ausschließlich die RcRE-Bindung vermitteln. Diese Vermutung konnte von C. Hartz experimentell bestätigt werden (Hartz, 2002). Dabei hatte sich gezeigt, dass durch die Mutation von jeweils zwei Arginin-Resten aus dieser Domäne *in vitro* das RcRE Bindevermögen von Rec nicht signifikant beeinträchtigt wird. Es ist

daher eher unwahrscheinlich, dass Arginin-Reste aus dieser Domäne sequenzspezifisch mit Nukleotiden des RcREs interagieren. Erst nach Mutation der gesamten Domäne konnte *in vitro* keine RcRE Bindung mehr gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise hat die Mutation der gesamten argininreichen Domäne bei Rec eine Konformationsänderung bewirkt, die eine RNA-Bindung verhindert hat.

Die Ergebnisse der Mutationsanalyse des RcREs (siehe 3.1) deuteten darauf hin, dass Rec über mehrere Kontaktpunkte, möglicherweise vier, an das RcRE bindet. Dazu muss Rec eine bestimmte Konformation besitzen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Leucin-Reste im Bereich der ersten und zweiten leucinreichen Domäne zur RcRE-Bindung beitragen. Aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaft kommen Leucin-Reste als spezifische Kontaktpunkte nicht in Frage. Lediglich das Tryptophan an Position 50 könnte mit der RNA interagieren. Die Analysen zum RNA-Bindevermögen der Rec-LRD Punktmutanten haben ergeben, dass jeweils die ersten beiden hydrophoben Aminosäuren aus beiden Domänen für die RcRE-Bindung essentiell sind. Für den drastischen Verlust des RcRE-Bindevermögens von Rec-LRD1mutI und II (W50A, L53A) sowie Rec-LRD2mutI und II (L77A, L78A) gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Eine Möglichkeit ist, dass Multimerisierung für eine stabile RcRE-Bindung benötigt wird und die entsprechenden Mutanten nicht mehr multimerisieren können. Eine zweite Möglichkeit ist, dass die Punktmutation zu einer veränderten Proteinstruktur von Rec geführt hat, die eine RcRE-Bindung nicht mehr oder nur noch stark eingeschränkt zulässt.

Bei drei der vier Rec-LRD Punktmutanten, die keine RcRE-Bindung mehr zeigen, erfolgte der Austausch von Leucin nach Alanin, bei einer Mutante von Tryptophan nach Alanin. Für die Aminosäure Tryptophan ist bekannt, dass sie mit Adenin interagieren kann. Es könnte sich daher bei dem Tryptophan der ersten leucinreichen Domäne um einen potentiellen Kontaktpunkt mit der RNA handeln. Die übrigen Leucin-Reste sorgen höchstwahrscheinlich für die richtige Faltung des Proteins.

Interessanterweise hat die Untersuchung des RNA-Bindevermögens von Rec-LRD2mutIII (L81A) und Rec-LRD2mutIV (L83A) ergeben, dass diese Mutanten sowohl an die aktive RcRE RNA (pcK30 RcRE) als auch an die inaktive RcRE RNA (LTR21 RcRE) binden können. Die computergestützte Vorhersage der Sekundärstruktur der RcRE RNAs hat für beide RNAs eine sehr komplexe, gefaltete Struktur mit zahlreichen „Stem-Loops“ ergeben, wobei sich laut DNASIS RNA Faltungsprogramm beide RcRE RNAs deutlich in der Anordnung der „Stem-Loops“ unterscheiden. Die Einführung der Punktmutation hat bei

den rekombinanten Proteinen Rec-LRD2mutIII (L81A) und Rec-LRD2mutIV (L83A) wahrscheinlich zu einer Proteinfaltung geführt, die sowohl eine Bindung an die pcK30 RcRE RNA als auch eine Bindung an die LTR21 RcRE RNA ermöglicht. Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob *in vivo* bei Verwendung von LTR21 RcRE RNA und Rec-LRD2mutIII und IV ein aktiver Exportkomplex aufgebaut wird.

Überraschenderweise hat die Mutante Rec-LRD1mutIII (L56A), die im *in vivo* Funktionstest 79% Aktivität gezeigt hat, bei Verwendung einer geringen Proteinmenge keine RcRE Bindung gezeigt. Auch bei Erhöhung der Proteinmenge hat man mit dieser Mutante nur eine Bande verringerter Mobilität erhalten. Jedoch muss man bedenken, dass es sich bei Rec-LRD1mutIII höchstwahrscheinlich um eine faltungssensitive Mutante handelt und für die RNA-Protein-Bindungsstudien rekombinantes, in *E. coli* exprimiertes Protein und *in vitro* transkribierte RNA verwendet wurden. Die Faltung von bakteriell exprimierten Proteinen ist nicht immer identisch mit der Faltung eukaryotisch exprimierter Proteine. Möglicherweise ist dies auch die Erklärung für den Verlust der RcRE-Bindung bei bakteriell exprimierten Rec-LRD1mutIII. Die Funktionsanalysen haben eindeutig gezeigt, dass Rec-LRD1mutIII *in vivo* an die RcRE RNA binden kann. Sowohl im p24 Test als auch in der Immunfluoreszenzanalyse konnte gezeigt werden, dass nach Kotransfektion von HL-Tat Zellen mit Rec-LRD1mutIII und dem HIVgag Reporterplasmid HIV Gag im Zytoplasma vorliegt. Zu der Expression von HIV Gag kann es nur durch den Rec-LRD1mutIII vermittelten Export des HIVgag Transkriptes gekommen sein. Einen ersten Hinweis auf Strukturunterschiede von eukaryotisch und bakteriell exprimierten Rec-LRD1mutIII könnte die CD Spektrometrie liefern, mit der die Anzahl von α -Helices und β -Faltblättern berechnet werden kann. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass bisher nicht bekannt ist, ob die aktive Form von Rec modifiziert, z.B. phosphoryliert, ist. Sollte sich herausstellen, dass Rec im aktiven Zustand z.B. phosphoryliert vorliegt, so würden die RNA-Protein-Bindungsstudien keine verlässlichen Daten liefern, da für diese Untersuchungen in *E.coli* exprimiertes Protein verwendet wurde, das nicht phosphoryliert ist.

Bei Bogerd et al. wurde zur Untersuchung des RcRE-Bindevermögens der Rec-Mutanten ein „Hefe-Drei-Hybrid“-Testsystem verwendet. Auch diese Untersuchungen haben ergeben, dass sowohl Mutationen der ersten (K7) als auch der zweiten leucinreichen Domäne (K11, K12) zum Verlust der RcRE-Bindung führen. Bogerd und Mitarbeiter führen den Verlust der RcRE-Bindung auf den Verlust der Multimerisierung dieser

Mutanten zurück, obwohl es keinen Beweis dafür gibt, dass bei diesen Mutanten tatsächlich die Multimerisierung gestört ist. Auch hier tritt wieder das Problem auf, dass für die Untersuchungen Fusionsproteine verwendet wurde und nicht absehbar ist, welchen Einfluss der Fusionsanteil auf die Funktionalität von Rec und Rec-Mutanten hat.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Hauptunterschied in der Interpretation der Ergebnisse von Bogerd und unserer Arbeitsgruppe darin besteht, dass wir aufgrund der erzielten Ergebnisse davon ausgehen, dass bei Rec die richtige Proteinfaltung für die Aktivität des Proteins entscheidend ist und der Funktionsverlust einiger Punktmutanten durch eine veränderte Proteinfaltung verursacht wurde. Dass sich die Punktmutationen auf die Faltung von Rec auswirken, haben die Lokalisations- und Funktionalitätsstudien von GFP-markiertem und nicht-markiertem Rec-Protein eindeutig gezeigt. Die Autoren der Veröffentlichung sind hingegen der Meinung, dass die Mutationen zu keiner Konformationsänderung bei Rec geführt haben und der Funktionsverlust auf die Mutation von Sequenzmotiven zurückzuführen ist. Desweiteren haben unsere Untersuchungen eindeutig gezeigt, dass das NES von Rec im Bereich der zweiten leucinreichen Domäne lokalisiert ist, während Bogerd und Mitarbeiter die erste leucinreiche Domäne als NES von Rec favorisieren.

3.5 Modellvorstellung über die Funktionsweise von Rec

Auf Grundlage der in dieser Dissertation gewonnenen Daten wird folgendes Modell für die Funktionsweise von Rec vorgeschlagen (Abb. 3.3). Rec wird im Zytoplasma synthetisiert. Anschließend gelangt das Protein über sein NLS, eine argininreiche Domäne, die sich im N-terminalen Bereich des Proteins befindet, in den Kern. Der daran beteiligte Importrezeptor ist noch nicht identifiziert (1). Im Kern bindet Rec an sein responsives Element (RcRE), das in der 3'U3-Region lokalisiert ist (2). Die Bindung erfolgt über mehrere Kontaktpunkte, wahrscheinlich vier, die sich innerhalb verschiedener „Stem-Loop“-Strukturen befinden. Für die Bindung müssen sowohl RcRE als auch Rec eine ganz bestimmte Konformation besitzen. Von essentieller Bedeutung sind dabei das Tryptophan sowie drei Leucin-Reste im Bereich der leucinreichen Domänen. Nur das Tryptophan kommt als potentieller Kontaktpunkt zur RNA in Frage, die restlichen drei Leucin-Reste sorgen für die richtige Faltung des Proteins. Für den Aufbau eines aktiven Exportkomplexes muss Rec als Dimer oder Tetramer vorliegen, dabei binden mehrere

Rec-Moleküle an das RcRE (3) und erst über die Multimerisierung dieser Moleküle entsteht ein stabiler Rec/RcRE-Komplex. Die Multimerisierungsdomäne erstreckt sich von Aminosäure 47 bis mindestens 78. Leucin-Reste in beiden leucinreichen Domänen sind für die Multimerisierung von Bedeutung. Der nukleäre Export des RNA-Protein-Komplexes erfolgt über Crm1. Dazu bindet Crm1 an sein Exportsignal (4), das sich im Bereich der zweiten leucinreichen Domäne befindet. Die Bindung von Crm1 an Rec erfolgt nur in Gegenwart von RanGTP und nur wenn Rec die richtige Konformation besitzt. Der tetramere Komplex, bestehend aus RNA/Rec, Crm1/RanGTP verlässt den Kern über die Nukleopore (5). Im Zytoplasma zerfällt der Komplex nach RanGTP-Hydrolyse in seine Bestandteile (6) und Rec wandert zurück in den Kern.

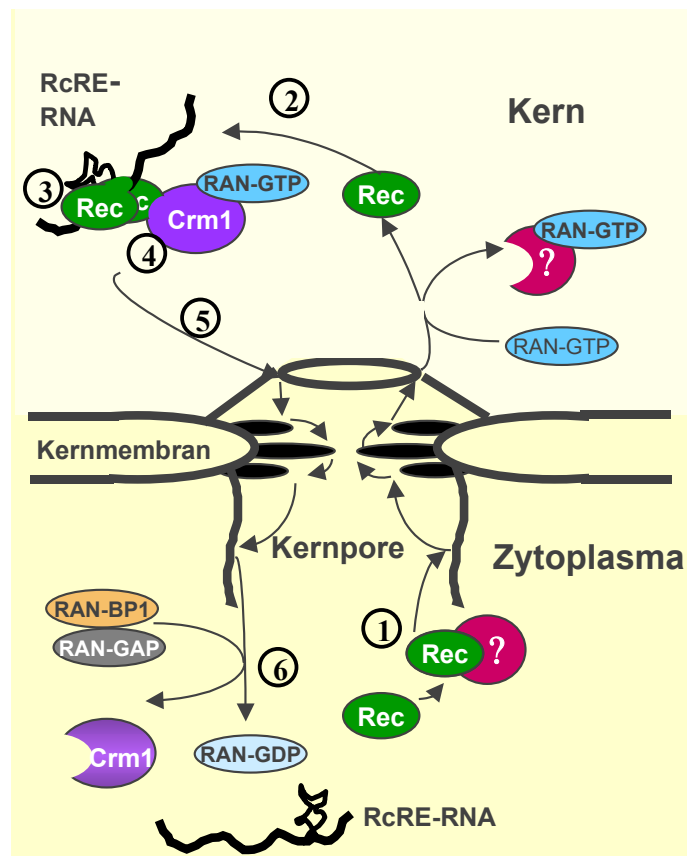


Abb. 3.3: Modell zur Funktionsweise von Rec (Erklärung im Text).

3.6 Vergleich von Rec/RcRE mit Rev/RRE und Rex/RxRE

Ein Vergleich der posttranskriptional regulatorischen Proteine Rec, Rev und Rex zeigt, dass die drei Proteine die gleiche Funktion besitzen, sich aber die Funktionsweise von Rec deutlich von der von Rev und Rex unterscheidet.

Bindung an die viralen Transkripte

Rec, Rev und Rex binden über charakteristische Bereiche an die virale RNA, die responsiven Elemente (RRE, RxRE, RcRE). Diese Bereiche sind von ausgeprägter Sekundärstruktur und setzen sich aus mehreren „Stem-Loop“-Strukturen zusammen. Für Rev und Rex konnte gezeigt werden, dass die Bindung an die responsiven Elemente über spezifische Sequenzmotive (20-30 Nukleotide) erfolgt, die sich in einer „Stem-Loop“-Struktur befinden. Bei Rec erfolgt die Bindung an das RcRE nicht über ein spezifisches Sequenzmotiv, sondern über eine komplexe, gefaltete RNA-Struktur. Dabei sind mehrere „Stem-Loop“-Strukturen an der Bindung beteiligt.

Exportrezeptor-Bindung

Für den Export der Transkripte benötigen Rec, Rev und Rex den zellulären Exportrezeptor Crm1. In Gegenwart von RanGTP bindet Crm1 über ein nukleäres Exportsignal (NES) an die Export-Adaptor-Proteine und vermittelt den Transport des RNA/Protein-Komplexes durch die Nukleopore ins Zytoplasma. Bei Rev und Rex erfolgt die Interaktion mit Crm1 ausschließlich über das NES. Für Rec hat sich gezeigt, dass das Vorhandensein eines NES alleine nicht ausreicht. Nur wenn Rec die richtige Konformation besitzt, kann es mit Crm1 interagieren.

Multimerisierung

Für Rev und Rex konnte gezeigt werden, dass Multimerisierung für die Funktion der Proteine von Bedeutung ist. Beide Proteine binden als Oligomere an die RNA. Bei Rev multimerisieren mehr als acht Rev-Moleküle auf dem RRE. Bei Rec gibt es Hinweise dafür, dass Multimerisierung für die Funktion von Bedeutung ist. Anders als Rev und Rex bindet Rec wahrscheinlich als Dimer, höchstens als Tetramer an die RcRE RNA. Eine Oligomerisierung, wie man sie bei Rev und Rex findet, kann aufgrund der bisher erzielten

Ergebnisse aus Transdominanz- und RNA-Protein-Bindungsstudien ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend haben die Untersuchungen zu Rec ergeben, dass es viele Gemeinsamkeiten zwischen den drei Proteinen Rec, Rev und Rex gibt, aber auch deutliche Unterschiede. Während bei Rev und Rex die Funktion über Sequenzmotive gesteuert wird, spielt bei Rec die Proteinfaltung eine entscheidende Rolle.

4 Zusammenfassung

Retroviren benutzen für die Transkription und Translation ihrer Gene den zellulären Transkriptions- und Translationsapparat. In eukaryotischen Zellen wird die RNA nach der Transkription prozessiert, erst danach verlässt sie den Kern. Die RNA-Prozessierung beinhaltet u.a. das vollständige Entfernen von Intronsequenzen (Spleißen). Bei Retroviren erfolgt die Translation bestimmter Proteine (Gag, Pol, Env) von ungespleißten und unvollständig gespleißten Transkripten. Um den nukleären Export dieser Transkripte sicherzustellen, haben Retroviren unterschiedliche Mechanismen entwickelt. Bei dem humanen endogenen Retrovirus HERV-K wird der Transport der ungespleißten und unvollständig gespleißten RNA über ein RNA-Adaptor-Protein reguliert. Solche posttranskriptionellen Regulatorproteine findet man auch bei anderen komplexen Retroviren, wie HIV und HTLV. Die regulatorischen Proteine HIV/Rev und HTLV/Rex sind sehr gut untersucht. Rev und Rex binden über sequenzspezifische Motive an charakteristische Bereiche auf der viralen RNA, die responsiven Elemente. Für die Ausbildung eines funktionalen Exportkomplexes müssen Rev und Rex auf der RNA oligomerisieren. In einem zweiten Schritt bilden Rev und Rex einen Komplex mit dem zellulären Exportrezeptor Crm1, der den Export des RNA/Protein-Komplexes vermittelt. Crm1 bindet über eine leucinreiche Domäne an Rev und Rex.

Das HERV-K spezifische RNA-Adaptor-Protein Rec zeigt große Ähnlichkeit zu Rev und Rex. Auch Rec bindet an einen charakteristischen Bereich auf der viralen RNA, das Rec responsive Element (RcRE). Das RcRE besitzt eine komplexe Sekundärstruktur, die sich aus mehreren „Stem-Loop“-Strukturen zusammensetzt. In unabhängigen *in vivo* und *in vitro* Funktionsanalysen, die u.a. im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Rec an das RcRE nicht, wie bei Rev und Rex, über ein sequenzspezifisches Motiv erfolgt. Mehrere „Stem-Loop“-Strukturen sind am Aufbau eines funktionalen Exportkomplexes beteiligt. Die Deletion von jeweils einer von vier relevanten „Stem-Loop“-Strukturen führt *in vitro* nicht zum Verlust der Rec-Bindung, *in vivo* wird aber der Aufbau eines aktiven Exportkomplexes verhindert. Für einen funktionalen Rec/RcRE-Komplex sind offensichtlich mehrere Kontaktpunkte wichtig.

Rev und Rex binden über eine argininreiche Domäne an ihre responsiven Elemente. Rec besitzt ebenfalls eine argininreiche Domäne, die für die RNA-Bindung von Bedeutung ist.

Aufgrund der Befunde aus den Untersuchungen zum RcRE war zu erwarten, dass neben der argininreichen Domäne weitere Bereiche existieren, die für die Bindung von Rec an die RNA essentiell sind. Im Rahmen dieser Dissertation konnte mit Hilfe von *in vitro* RNA-Protein-Bindungsstudien gezeigt werden, dass bestimmte Aminosäuren im Bereich von zwei leucinreichen Domänen für die RcRE-Bindung von Bedeutung sind. Die Mutation des Tryptophan an Position 50 sowie der Leucin-Reste an Position 53, 77 oder 78 führte jeweils zum Verlust der RNA-Bindung. Aufgrund der physikalischen Eigenschaften dieser Aminosäuren kommt nur das Tryptophan als potentieller Kontaktpunkt zur RNA in Frage. Die übrigen Leucin-Reste sind wahrscheinlich für die richtige Faltung des Proteins von Bedeutung. Zusammenfassend haben die Untersuchungen zum RcRE und zur RNA-Bindedomäne von Rec ergeben, dass für einen funktionalen Rec/RcRE-Komplex sowohl Rec als auch RcRE-RNA eine bestimmte Struktur besitzen müssen.

Bei Rev und Rex ist Oligomerisierung essentiell für den Aufbau eines funktionalen Exportkomplexes. Die Befunde aus den *in vivo* Funktionstests und *in vitro* RNA-Protein-Bindungsstudien, die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurden, legen nahe, dass Multimerisierung auch bei Rec für die Funktion essentiell ist. Im Unterschied zu Rev und Rex, scheint Rec nur als Dimer oder maximal als Tetramer an das RcRE zu binden und nicht als Oligomer.

Der Export der viralen Transkripte erfolgt bei Rev und Rex im Komplex mit Crm1. Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir mit Hilfe von Crm1-Kompetitionsexperimenten, die mit „Pendel“-Proteinen, die das NES von Rev und Rex trugen, durchgeführt wurden, indirekt zeigen, dass Crm1 am Rec-abhängigen RNA-Export beteiligt ist. Über Ko-Immunpräzipitation ist es uns gelungen eine direkte Interaktion zwischen Crm1 und Rec nachzuweisen. Crm1 bindet häufig über leucinreiche Exportsignale (NES) an sein Exportcargo. Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir erstmals zeigen, dass sich das NES von Rec im Bereich der zweiten leucinreichen Domäne (AS 77-83) befindet und nicht, wie in der Literatur beschrieben, im Bereich der ersten leucinreichen Domäne (AS 50-59) lokalisiert ist. Die Untersuchungen deuten auch darauf hin, dass das NES von Rec nur im Rahmen der nativen Rec-Struktur funktional ist.

Zusammenfassend haben die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen gezeigt, dass die drei regulatorischen Proteine Rev, Rex und Rex zwar die gleiche Funktion besitzen, dass sich aber die Funktionsweise von Rec deutlich von der von Rev und Rex unterscheidet. Während bei Rev und Rex die Funktion über Sequenzmotive gesteuert wird, spielt bei Rec die Proteinfaltung eine entscheidende Rolle.

5 Material und Methoden

5.1 Allgemeine Materialien und Geräte

Liste der häufig genutzten Materialien und Geräte:

Autoklaven:	Hochdruckdampfsterilisator LS6/6/6-2FD-GT KT 77.169 (BHS Medizintechnik), Bioclav (Schütt)
Chemikalien:	soweit nicht anders angegeben von den Firmen Boehringer Mannheim, Invitrogen, Merck, New England Biolabs, Sigma, Roth
Glasgeräte:	Bechergläser, Glaspipetten, Meßzylinder, Erlenmeyerkolben (Schott, Brand)
Handschuhe:	Manufix (Braun)
Kühlschrank (4 °C) :	Liebherr
Magnetrührer:	RET GS (Ikamag)
pH-Meter:	Mikroprozessor-pH-Meter (Knick)
Pipetten und -spitzen:	Eppendorf
Plastik-Gefäße:	0,2 ml Gefäße, 1,5 ml, 2 ml Gefäße (Eppendorf), 12 ml, 20 ml, 25 ml, 50 ml Röhrchen (Greiner bio-one)
Thermomixer:	Modell 5436 und 5437 (Eppendorf)
Tiefkühlschränke:	-20°C (Liebherr), - 85°C Ultra Low Freezer (New Brunswick Scientific)
Vortexer:	Heidolph Reax 2000
Waagen:	Excellence (Sartorius); 2024 MP (Sartorius) Feinwaage: 2024 MP (Sartorius)
Wasserbad:	Köttermann
Zentrifugen:	Tischzentrifugen: Picofuge (Stratagene), Biofuge (Modelle 15R, 13 oder A; Heraeus), Centrifuge 5402 (Eppendorf) Untertischzentrifuge: Varifuge 3.0 (Heraeus);
Photometer:	Spectronic 1201 (Milton Roy)
Speed Vac:	SVC 100 (Savant)

Transformator:	Electrophoresis Power Supply-EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech), Power Pac 300 (Bio Rad)
Gelelektrophoresecammer zur Proteintrennung:	Novex Mini-Cell
Gelelektrophoresecammer zur DNA-Auftrennung:	diverse Gelapparaturen (NEB, Owl Scientific)
Westernblotapparatur:	Hoefer
Wippschüttler:	Biometra WT12
Ultraschallstab:	Soniefire 250
Thermocycler:	T3 Thermocycler (Biometra)
Sterilbank:	Lamin Air HLB2448 BS (Heraeus)
Schüttelinkubator:	New Brunswick Scientific Edison N.J. USA
Brutschrank:	Typ B5050E (Heraeus)

5.2 Bakterienkultur

5.2.1 Medien und Chemikalien

LB-Medium:	Luria-Bertani-Medium 1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Bacto Hefe-Extrakt, 1 % NaCl, pH 7,0; autoklaviert
LB-Amp-Medium:	LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin
LB-Kan-Medium:	LB-Medium mit 30 µg/ml Kanamycin
LB-Agar-Platten:	1,5 % Bacto-Agar in LB-Medium, pH 7,0; autoklaviert
LB-Amp-Platten:	LB-Agar-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin
LB-Amp-X-Gal-Platten:	LB-Agar-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin und 80 µg/ml X-Gal
LB-Kan-Platten:	LB-Agar-Platten mit 30 µg/ml Kanamycin
SOC-Medium:	2 % Bacto-Trypton, 0,5 % Bacto-Yeast Extract, 8,5 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 20 mM Glucose; pH 7,0; sterilfiltriert

TFB1-Puffer:	30 mM K-Acetat, 100 mM RbCl, 50 mM Mn(II)Cl ₂ , 10 mM CaCl ₂ , 15 % Glycerol, pH 5,8; sterilfiltriert
TFB2-Puffer:	10 mM MOPS, 75 mM CaCl ₂ , 10 mM RbCl, 15 % Glycerol, pH 6,5; sterilfiltriert

5.2.2 Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i> DH5 α :	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE)	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> M15[Rep4]	Qiagen

5.2.3 Anlegen einer Übernachtskultur

Aliquots als Glycerol-Stock konservierter Bakterien oder Kolonien von einer Klonierungsplatte werden in 5 ml LB-Medium mit der entsprechenden Antibiotikaresistenz überführt und über Nacht bei 37 °C und 225 rpm im Schüttelinkubator herangezogen.

5.2.4 Erzeugung kompetenter Bakterien

100 ml LB-Medium werden mit 4 ml einer frischen Übernachtskultur beimpft. Die Bakterien werden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,7 im Schüttelinkubator bei 37 °C herangezogen (Dauer ca. 2 Stunden). Die Zellen werden 5 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 3500 rpm und 4°C zentrifugiert. Die folgenden Schritte müssen bei einer Temperatur von 4 °C und mit vorgekühlten Geräten durchgeführt werden. Die pelletierten Zellen werden in 20 ml kaltem TFB1-Puffer resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Bakteriensuspension für 10 min bei 3500 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 2 ml TFB2-Puffer resuspendiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis werden die kompetenten Zellen als 100 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

5.2.5 Transformation rekombinanter DNA

100 µl kompetenter Bakterienzellen werden auf Eis aufgetaut und mit 2-10 ng DNA versetzt. Es folgt eine 30-minütige Inkubation auf Eis, bei der sich die DNA an die Bakterienzellwand anlagert. Ein Hitzeschock von 45-90 sec bei 42 °C und eine weitere Inkubation auf Eis von 2 min schließen sich an. Bei diesem Schritt werden die Bakterien einer Streßsituation ausgesetzt, die es ihnen ermöglicht die angelagerte DNA aufzunehmen. Nach Zugabe von 500 µl SOC-Medium werden die Zellen eine Stunde bei 37 °C und 225 rpm im Schüttelinkubator vermehrt. Die Bakterien werden durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 2000 rpm pelletiert. Der Überstand wird dekantiert und das Bakterienpellet wird im SOC-Medium resuspendiert. Die Bakteriensuspension wird auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die ausgestrichenen Platten werden bei 37 °C über Nacht oder bei Raumtemperatur über mehrere Tage inkubiert. Anschließend können einzelne Kolonien mit einer Impföse in Medium mit entsprechendem Antibiotikum überführt werden.

5.2.6 Selektion positiver Klone

Die Selektion der positiven Klone erfolgt durch den jeweiligen Selektionsmarker, der sich auf dem verwendeten Plasmid befindet. Häufig besteht ein solcher Selektionsmarker aus einer spezifischen Antibiotikaresistenz. Eine weitere Selektion kann mittels der Blau-weiß-Selektion erreicht werden, die auf der sogenannten α -Komplementation beruht. Bakterienstämme, die eine Mutation im 5'-Bereich des lacZ-Gens aufweisen, können keine aktiven Tetramere der β -Galaktosidase bilden. Komplementation mit dem plasmidkodierten lacZ α -Peptid (26 AS N-terminales lacZ-Fragment) führt zur Wiederherstellung der enzymatischen Aktivität. Wird der Leserahmen des α -Peptids im Plasmid-Polylinker durch Insertion unterbrochen, können solche Insert-tragenden Kolonien anhand mangelnder Enzymaktivitäten identifiziert werden. Das chromogene Substrat X-Gal kann nicht umgesetzt werden. Resultat sind weiße Kolonien.

5.2.7 Plasmid-Minipräparation

Die in Bakterien eingeschleuste rekombinante DNA kann mit Hilfe der Plasmidpräparation gewonnen werden. Für eine Plasmidisolierung im kleinen Maßstab werden 2 ml einer Übernachtskultur verwendet. Mit Hilfe des „Qiaprep Spin Miniprep Kit“ der Firma Qiagen wird nach den Angaben des Herstellers die Plasmid-DNA isoliert. Die Qiagen-Säulen enthalten ein Anionen-Austauscher-Material auf Silicabasis. Die in dem Zelllysat enthaltene DNA bindet aufgrund ihrer negativen Ladung an das Anionen-Austauscher-Material in der Säule. Hierbei kommt es zur Interaktion zwischen dem negativ geladenen Sauerstoffatom des Phosphates der DNA und dem positiv geladenen Stickstoffatom des DEAE (Diethylaminoethanol). Nach der Elution der DNA kann die Konzentration photometrisch bestimmt werden.

5.2.8 Plasmid-Midi- und Maxipräparation

Durch eine Midi- bzw. Maxipräparation kann Plasmid-DNA in einem größeren Maßstab isoliert werden.

Es werden 50 ml einer Übernachtskultur verwendet und nach den Angaben der Firma Qiagen für das "Qiagen Plasmid Midi Kit" behandelt. Diese Plasmid-Aufreinigung basiert ebenfalls auf der Interaktion der DNA mit dem Anionen-Austauscher-Material der Qiagen-Säule. Die Plasmid-DNA bindet unter niedriger Salzkonzentration an das Anionen-Austauscher-Material der Säule und wird durch Erhöhung der Salzkonzentration eluiert. Bei Verwendung der isolierten Plasmid-DNA für Transfektionen in eukaryotische Zelllinien sollte die DNA endotoxinfrei vorliegen, da sich diese bei der Transfektion als stören erwiesen haben. Hierfür wird das „Endofree Plasmid Buffer Set“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

5.2.9 Einfrieren von Bakterien

Eine frische Übernachtskultur wird mit ca. 20-30% Glycerol versetzt. Die Bakteriensuspension kann anschließend bei -80 °C gelagert werden.

5.3 DNA-Techniken

5.3.1 Restriktion von Plasmid-DNA

Verwendete Restriktionsenzyme:	NEB
Puffer:	10-fach Puffer, vom Hersteller jeweils mitgeliefert
BSA:	100-fach, 10 mg/ml bovines Serum-Albumin

Isolierte DNA kann mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen (Typ II), die jeweils spezifische Basensequenzen erkennen, geschnitten werden. Diese Restriktionsenzyme sind in der Lage, die Phosphodiester-Bindungen im doppelsträngigen DNA-Molekül zu spalten. Bei der Spaltung können 5'- bzw. 3'- überlappende oder glatte DNA-Enden entstehen. Die Reaktionsbedingungen (Temperatur, Puffer und gegebenenfalls BSA-Zusatz) werden nach Angaben des Herstellers gewählt. Pro µg DNA werden 1-2 Units Enzym zugesetzt. Die unterschiedlichen Restriktionsenzyme zeigen bei Zugabe des spezifischen Puffers 100% Aktivität. Bei Verwendung von zwei unterschiedlichen Enzymen in einem Restriktionsansatz muß ein Puffer eingesetzt werden, der für beide Enzyme geeignet ist. Das Volumen des Restriktionsansatzes richtet sich nach der eingesetzten DNA-Menge, die nicht mehr als 1 µg/10 µl Ansatz betragen sollte. Die Inkubationsdauer ist von der DNA- und Enzymmenge abhängig. Kontrollrestriktionen von Mini-, Midi- und Maxipräparationen werden für ca. 2 Stunden in 10-20 µl Gesamtvolumen inkubiert. DNA-Material für Klonierungen wird über Nacht in einem größeren Volumen inkubiert.

5.3.2 Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel

Agarose:	Seakem LE Agarose FMC (Invitrogen)
TAE-Puffer:	40 mM Tris-Acetat; 1 mM EDTA
Ethidiumbromid-Lösung:	10 mg Ethidiumbromid/ml H ₂ O
DNA-Probenpuffer (10×):	20 % [w/v] Ficoll 400; 100 mM EDTA; 0,025 % (w/v) Bromphenolblau; 0,025 % [w/v] Xylencyanol
Agarosegelkammer:	diverse Gelapparaturen (NEB, Owl Scientific)
Transformator:	Power PAC 300 (BIO-RAD)
DNA-Größenstandard:	100 bp ladder (Invitrogen, Promega)

1 kb plus ladder (Gibco, Promega)

Transilluminator: Biometra TI 2

Ein Gemisch von DNA-Fragmenten kann mit Hilfe eines Agarosegels aufgetrennt werden. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatreste der DNA wandert diese im elektrischen Feld zur positiven Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist bei konstanter Feldstärke umgekehrt proportional zur Molekülgröße. Diese physikalische Eigenschaft wird bei der Auftrennung von unterschiedlich großen Fragmenten genutzt. Die Größe der Fragmente wird durch einen Größenstandard, der DNA-Fragmente definierter Größe enthält, bestimmt. Für eine gute Auftrennung der DNA-Fragmente wird die Konzentration des Gels entsprechend der zu erwartenden Größe des DNA-Fragmentes gewählt. Zur Auftrennung großer DNA-Fragmente (>2-3 Kb) wird ein niedrig prozentiges Agarosegel (0,8%) eingesetzt. Bei kleineren Fragmenten (0,1-0,3 kb) wird ein höher prozentiges Gel (1-2%) verwendet. Die DNA wird vor dem Auftragen in die Geltaschen mit einem Probenpuffer (*loading buffer*) versetzt, der die Dichte der DNA-Probe erhöht, dadurch sinkt die Probe auf den Boden der Geltasche ab. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt je nach Größe der Gelkammer bei 80-100 V. Anschließend wird das Gel für wenige min in ein Ethidiumbromid-Bad eingelegt. Dieses Reagenz interkaliert mit der DNA und kann durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt werden.

5.3.3 DNA Extraktion aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung über ein Agarosegel wird die Bande, die das gewünschte DNA-Fragment enthält, aus dem Gel ausgeschnitten. Die in dem Gelstück enthaltene DNA kann mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) isoliert werden. Die Durchführung erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

5.3.4 Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNA

CIP: Calf Intestinal Phosphatase, 1 U/μl (NEB)

Puffer: 10-fach vom Hersteller mitgeliefert (NEB)

Bei einer Dephosphorylierung werden die 5'-endständigen Phosphatgruppen restringierter DNA durch das Enzym Alkalische Phosphatase (CIP) abgespalten. Durch diese Reaktion

kann die Religation des geschnittenen Vektors verhindert werden. Die Dephosphorylierung wird mit 1 U CIP-Enzym pro µg DNA für 45 min bei 37°C durchgeführt. Durch 10-minütiges Erhitzen bei 65 °C kann das Enzym inaktiviert und die Reaktion beendet werden.

5.3.5 Ligation von DNA

Enzym: T4 Ligase (NEB)

Puffer: 5-fach Puffer, vom Hersteller mitgeliefert (NEB)

Bei dem Vorgang der Ligation kommt es zur Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen der freien 5'-Phosphatgruppe und der freien 3'-OH-Gruppe. Die Ligation wird in der Regel in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Die Menge an linearisierten Vektor beträgt 50-100 ng. Das zu klonierende Fragment wird in einem 2-5 fachen molarem Überschuss zugegeben. Die einzusetzende Insertmenge kann bei vorgegebener Vektormenge durch die folgende Formel berechnet werden:

$$Insert [ng] = \frac{Vektor [ng] * Insertgröße [Kb]}{Vektorgroße [Kb]} * molares Verhältniss \quad Insert / Vektor$$

Zu dem Ligationsansatz werden 0,5 – 1 U Enzym gegeben. Der Ansatz kann bei 14°C über Nacht oder 2h bei RT inkubiert werden.

5.3.6 Phenol-Chloroform-Extraktion

Phenol-Chloroform: Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol
Verhältnis 25:24:1

Chloroform-Isoamylalkohol: Chloroform, Isoamylalkohol
Verhältnis 24:1

Die wässrige DNA-Lösung wird mit dem gleichen Volumen einer Phenol-Chloroform-Lösung versetzt und etwa eine Minute kräftig gevortext. Anschließend wird für zwei min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase, in der sich die DNA befindet, wird abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. In der unteren

organischen Phase befinden sich die Proteine, die durch diesen Schritt von der DNA getrennt wurden. Phenolreste werden durch Zugabe gleichen Volumens einer Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung entfernt. Erneut wird eine Minute kräftig gevortext und bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wird abgenommen und der Rest verworfen. Die DNA wird nun über ein präparatives Gel aufgereinigt oder gefällt.

5.3.7 Fällung von DNA

3 M Natriumacetat-Lösung, pH 6.0; Ethanol 96%, Ethanol 70%

Die DNA-Probe wird mit 0,1 Volumenteil einer 3 M Natriumacetatlösung versetzt und gut geschüttelt. Es folgt eine Zugabe von 2 - 2,5 Volumenteilen Ethanol 96%. und erneutes Schütteln der Lösung. Die DNA wird 20 min bei - 20 °C präzipitiert und anschließend bei 14.000 rpm 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, während das Pellet mit ca. 1 ml 70% Ethanol gewaschen wird, um die restlichen Salze zu entfernen. Es folgt ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 14.000 rpm und 4°C. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in der Speed Vac getrocknet. Die DNA wird mit einem entsprechenden Volumen Aqua bidest über Nacht gelöst.

5.3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1985)

Sterilbank:	Lamin Air HLB 2448 GS (Heraeus)
Cycler:	T3-Thermocycler (Biometra)
Polymerase:	Ampli Taq DNA Polymerase (Applied Biosystems)
Puffer:	10-fach Puffer, vom Hersteller mitgeliefert (Applied Biosystems)
Nukleotide:	dNTP-Mix 10 mM (Applied Biosystems)
Zusatz:	25 mM MgCl ₂

Die PCR ist ein *in vitro* Verfahren zur Amplifizierung definierter Nukleinsäurebereiche. Die Synthese erfolgt in drei Reaktionsschritten, die zyklisch wiederholt werden. 1. Denaturierungsschritt: bei diesem Schritt werden die beiden Stränge der Matrizen-DNA, sowie in späteren Zyklen die Stränge der PCR-Produkte voneinander getrennt. 2. „Annealing“-Schritt: Während dieses Schrittes erfolgt die Hybridisierung der im

Überschuss vorhandenen Oligonukleotide an die einzelsträngige Matrizen-DNA. 3. „Elongations“-Schritt: Bei diesem Schritt erfolgt die Synthese des DNA-Doppelstranges. Ein Reaktionsansatz für 100 µl Gesamtvolumen setzt sich wie folgt zusammen:

Reaktionsansatz für 100 µl:	10 µl 10-fach Puffer
	8 µl dNTP-Mix (je 10 mM)
	1 µl Primer 1 und 2 (10 pmol)
	1 -100 ng DNA
	4 µl MgCl ₂ (25 mM)
	0,5 µl AmpliTaq DNA Polymerase (2,5 U)

Alle Parameter der PCR müssen für jede Reaktion optimiert werden.

5.3.9 “Assembly” PCR

Die „Assembly“-PCR dient dazu, spezifische Punktmutationen in die DNA einzuführen. Wie in Abbildung 4.1 dargestellt, müssen drei separate PCR-Reaktionen durchgeführt werden. Die ersten beiden PCR-Reaktionen dienen zur Herstellung zweier überlappender PCR-Fragmente, die an der sich überlappenden Stelle die Mutationen tragen. Die Mutation wird über die Primer P2 und P3 (rot dargestellt) eingeführt. Diese sich überlappenden PCR-Produkte werden in die nächste PCR-Reaktion eingesetzt, dort übernehmen sie sowohl die Funktion von Primern als auch die der Matrizen-DNA. In der ersten Runde erfolgt über die freien 3'OH-Enden der PCR-Produkte die Vervollständigung des komplementären Sequenz-Bereiches. In der zweiten Runde dienen diese DNA-Fragmente als Matrizen-DNA. Über die äußeren Primer (P1, P4) erfolgt die Anreicherung der DNA-Fragmente.

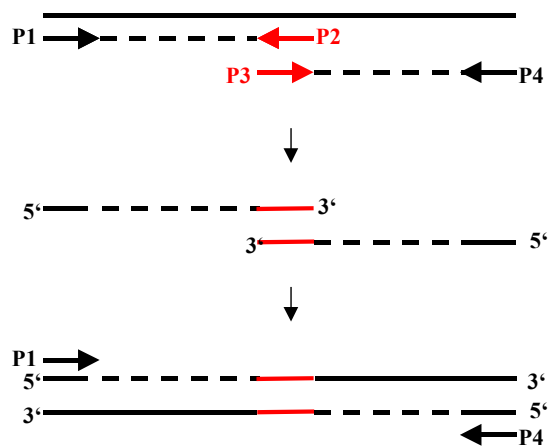


Abb. 5.1: Schematische Darstellung der „Assembly“ PCR (Erklärung im Text)

5.4 Zellkultur

5.4.1 Geräte und Materialien

Brutschrank:	Cytoperm (Heraeus)
Sterilbank:	Lamin Air HLB 2448 BS (Heraeus)
Mikroskop:	ID 02 (Zeiss)
Zellkulturflaschen:	80 cm ² , Nunclon (Nunc Brand Products)
Mundschutz:	Coldex
Einfrierampullen:	Greiner
Stickstofftonne:	BT55/BT40 (L'air liquide)

5.4.2 Medien und Chemikalien

DMEM:	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium; 1g/l Glukose
FKS:	Fötales Kälberserum (PAA)
L-Glutamin:	100-fach, 200 mM

NSP:	250-fach, Neomycin, Streptomycin, Penicillin; je 10.000 U/ml in Hank's Lösung
PBS (ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}):	137 mM NaCl, 3 mM KCl, 16,5 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4
Versen:	159 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 , 2,7 mM Versen (=EDTA)
Trypsinlösung:	10 ml 2,5 % Trypsin, 40 ml Versen, 50 ml PBS

5.4.3 Zellen

HeLa (HL):	humane Zervixkarzinom-Zelllinie
HeLa tat (HL-tat):	humane Zervixkarzinom-Zelllinie (HeLa) mit stabil transfiziertem Ein-Exon-Tat (HIV-Transaktivator) (Schwartz et al., 1990) (bereitgestellt von B. Felber und G.N. Pavlakis)

5.4.4 Halten und Vermehren der Zelllinie

Die Zelllinie wird in DMEM-Medium mit 10 % FKS, 2 mM L-Glutamin und NSP, einer Antibiotikallösung, gehalten. Zweimal in der Woche werden die Zellen 1:4 (HeLa) oder 1:5 (HeLa tat) geteilt. Hierbei wird zunächst das alte Medium abgeschüttet. Die Zellen werden zweimal mit ca. 5 ml Trypsinlösung durch kurzes Schwenken der Zellkulturflasche gewaschen. Ein Rest der Trypsinlösung wird beim Abschütten zurückbehalten. Nach einer 2-5-minütigen Inkubation der Zellen mit der Trypsinlösung können die Zellen vorsichtig von ihrer Unterlage abgeklopft werden. Anschließend wird eine der Teilungsrate entsprechende Menge an Zellmedium zugegeben und die Zellen durch mehrmaliges Aufziehen einer Pipette vereinzelt. 1 ml der Zellsuspension wird in eine frische Zellkulturflasche, die mit 20 ml Medium gefüllt und mit CO_2 begast wurde, überführt. Die Zellen werden im Brutschrank bei 37° C, mit 5 % CO_2 und 80 % Luftfeuchtigkeit gehalten.

5.4.5 Transfektionen

Transfektionsreagenz:	Lipofectamin Plus Reagenz (Invitrogen)
Trypanblau:	0,5 % in PBS (ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}) (Merck)

Zählkammer:	Fuchs Rosenthal
Sechsllochplatten:	Makroplatte TC mit Abdeckplatte (Nunc Brand Products)
Deckgläser:	Superfrost, 18x18 mm (Menzel)
gestopfte Spitzen:	Biozym budget line Safe Seal Tips (Biozym)

Die mit Hilfe der Plasmid-Midipräparation isolierte DNA kann mittels Transfektion in die gewünschten Zellen eingebracht werden. Die Transfektionen werden in Sechsllochplatten durchgeführt, dazu werden einen Tag vor der Transfektion $0,5 \times 10^6$ HeLa/HeLa-tat Zellen pro Well auf sterile Deckgläschen ausgesät. Zur Zellzahlbestimmung werden die Zellen durch Trypsineinwirkung und durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Pipette vereinzelt. Es wird ein Zell-Aliquot 1:20 mit Trypanblau versetzt, welches ermöglicht, die lebenden Zellen von den blau angefärbten toten Zellen zu differenzieren. Die angefärbte Zellsuspension wird in eine Zählkammer überführt und ausgezählt.

Herstellung des Transfektionsansatzes für je ein Loch einer Sechsllochplatte:

- A) Es werden 1 µg DNA in 94 µl serumfreies Medium verdünnt. Anschließend wird 6 µl PLUS Reagenz zugegeben, gut gemischt und die Mischung für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- B) 4 µl LIPOFECTamine werden in 100 µl serumfreies Medium gegeben und gemischt. Diese Liposomensuspension wird zu der DANN-Plus-Suspension pipettiert, gut gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

In der Zwischenzeit werden die Zellen einmal mit serumfreiem Medium gewaschen. Anschließend wird 800 µl serumfreies Medium in jedes Loch pipettiert und die Liposomen-DNA-Mischung zugegeben. Während der anschließenden 3-5 stündigen Inkubation im Brutschrank fusionieren die Liposomen-DNA-Komplexe mit der Zellmembran mittels Endocytose und die DNA gelangt in die Zelle. Danach werden 4 ml serumhaltiges, warmes Medium zugegeben. Die Transfektanten werden für weitere 24-48 h im Brutschrank inkubiert.

Die Zellen, die für die Immunfluoreszenzanalyse bestimmt sind, werden 24 oder 48 Stunden nach der Transfektion mit 2 % Paraformaldehyd in PBS für 45 min fixiert und 3 mal mit je 5 ml PBS gewaschen. Zellen, deren p24-Gehalt analysiert werden soll, werden 48 Stunden nach der Transfektion nach zweimaligem Waschen mit je ca. 5 ml PBS mit 500 µl 1-fach Lysispuffer (Cell Culture Lysis Reagent, Promega) lysiert (ca. 5-10 min). Das Lysat wird 10 sec bei 4 °C und 10.000 rpm zentrifugiert (Biofuge R), um Zelltrümmer zu entfernen, das geklärte Lysat wird im Assay eingesetzt.

5.5 Proteintechniken

5.5.1 Proteininduktion

IPTG:	1 M Stammlösung
Bakterien:	BL21-DE3 (Invitrogen), Rep[M15] (Qiagen)
Medium:	LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin

Ein prokaryotischer Expressionsvektor ist mittels Transformation in die Bakterienzellen eingeschleust worden. Die Zellen wurden anschließend auf LB-Amp-Platten ausplattiert. Am nächsten Tag wird eine Einzelkolonie gepickt und eine Übernachtskultur angelegt. Ein entsprechendes Volumen LB-Medium wird mit der frischen Übernachtskultur in einem Verhältnis von 1:10 angeimpft. Die Zellen werden bei 37 °C und 225 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Bei einer $OD_{600} = 0,5 - 0,7$ werden die Zellen mit 2 mM IPTG induziert und nach 5 Stunden durch 10-minütiges zentrifugieren bei 3500 rpm, 4 °C geerntet. Das Bakterienpellet kann bei – 20 °C gelagert werden.

5.5.2 Aufreinigung nativer Proteine über Kationen-Austausch-Chromatographie

Puffer:	50 mM CAPSO (Sigma), pH 9,7; 50 mM NaPO ₄ , pH 6,8
Säulenmaterial:	Kationen-Austauscher: SP-Sepharose (Amersham)
Säule:	Poly-Prep Chromatography columns (Bio Rad)
Rollrad:	Heidolph
Ultraschallstab:	Soniefire 250
Enzyme:	Dnase
Protease Inhibitor:	Protease Inhibitor cocktail tablets (Roche)

Bei der Kationenaustausch-Chromatographie wird das zu reinigende Protein in einem Puffer aufgenommen, in dem es eine positive Ladung trägt. Über die positive Ladung des Proteins erfolgt die Bindung an das negativ geladene Säulenmaterial.

Für die Reinigung von Rec und Rec-Mutanten wird als Bindepuffer 50 mM Capso, pH 9,7 und für die Reinigung der RanQ69L-Mutante 50 mM NaPO₄, pH 6,8 verwendet. Das

Bakterienpellet von 200 ml Kultur wird auf Eis aufgetaut und anschließend in 8 ml des entsprechenden Bindepuffers aufgenommen. Es erfolgt die Zugabe von DNase [5 µg/ml] und Protease Inhibitor. Alle folgenden Schritte werden auf Eis ausgeführt. Die Zellen werden durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und die Zelltrümmer durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 11.000 rpm und 4°C von den löslichen Proteinen getrennt. Eine entsprechende Menge SP-Sepharose wird 1 x mit Aqua bidest und 2 x mit dem entsprechenden Bindepuffer gewaschen und in die Säule gefüllt (je 400 µl). Anschließend wird die Säule mit dem Lysat beladen. Die Bindung der Proteine an das Säulenmaterial erfolgt unter Rotation bei 4°C für 1 h. Danach wird die Sepharose mit einem großen Volumen an Bindepuffer gewaschen. Dieser Schritt dient der Entfernung nicht gebundener Proteine. Die Reinigung des Proteins erfolgt über einen Salzgradienten, der für jedes Protein experimentell bestimmt werden muss. Die Reinigung von Rec und Rec-Mutanten erfolgt in drei Schritten. Zur Entfernung von schwächer gebundenen Proteinen wird die Sepharose mit einem großen Volumen (10-15 ml) 50 mM Capso, pH 9,7; 500 mM NaCl und 2 ml 50 mM Capso, pH 9,7; 600 mM NaCl gewaschen. Das Protein wird anschließend mit 5 ml 50 mM Capso, pH 9,7; 1M NaCl von der Säule eluiert. Die Reinigung von RanQ69L erfolgt in einem Zweischritt-Verfahren. Zur Entfernung schwächer gebundener Proteine wird das Säulenmaterial mit einem großen Volumen (10-15 ml) 50 mM NaPO₄, pH 6,8; 150 mM NaCl gewaschen. Das Protein wird mit 5 ml 50 mM NaPO₄, pH 6,8; 260 mM NaCl eluiert. Die Proteinkonzentration in den Eluaten wird über Bradford bestimmt, während die Reinheit des Proteins über eine SDS-PAGE überprüft wird. Das eluierte Protein wird aliquotiert und bei -80°C gelagert.

5.5.3 Proteinbestimmung (nach Bradford)

Färbe-Reagenz:	5-fach, dye reagent concentrate (Bio Rad)
BSA:	10 mg/ml bovines Serum Albumin
Küvetten:	1,5 ml halbmikro Einmalküvetten (Brand)
Photometer:	Spectronic 1201 (Milton Roy)

Es wird eine BSA-Eichgerade mit 0-50 mg/ml BSA erstellt, an der die Proteinkonzentrationen bestimmt werden. Zu je 2,5 ml 1-fach Färbe-Reagenz (BioRad) werden insgesamt 50 µl Proteinlösung zugegeben. Hierbei kann die zu messende Probe

verdünnt oder unverdünnt eingesetzt werden. Die Messung sollte innerhalb von 20 min bei einer OD₅₉₅ durchgeführt werden.

5.5.4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Gelapparatur:	Mighty small II SE 250 (Hoefer Scientific Instruments)
Transformator:	Electrophoresis Power Supply-EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech)
DTT:	30-fach; Dithiothreitol (NEB)
Laufpuffer:	25 mM Tris-HCl, 250 mM Glycin, 0,1 % SDS[w/v], pH 8,3
Auftragspuffer:	3-fach SDS-Auftragspuffer (NEB)
Marker:	MultiMark Multi-Colored Standard (Novex) Bench-Mark Ladder Marker (Invitrogen)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine in Gegenwart eines Überschusses an Natriumdodecylsulfat (SDS) entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Unter denaturierenden Bedingungen lassen sich Proteine aufgrund ihrer Masse in Polyacrylamidgelen trennen. Das Proteingemisch wird zunächst unter Zusatz von SDS gelöst. SDS ist ein Detergenz, das fast alle nichtkovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört. Die SDS-Anionen lagern sich in einem konstanten Gewichtsverhältnis an die Proteine an. Durch die nach außen gerichteten negativen Sulfatgruppen wird die ursprüngliche Ladung des nativen Proteins kompensiert und alle Proteine wandern in einem elektrischen Feld zur Anode. Die Proteine werden somit über ein konstantes Ladungs/Masse-Verhältnis vergleichbar. Zur Reduktion von Disulfidbrücken wird zusätzlich Dithiothreitol (DTT) zugegeben. Die Komplexe aus SDS und denaturiertem Protein werden auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und bei 50 mA (Gradientengel) oder 125 V (Novex-Fertiggele) aufgetrennt. Im Gel können die Proteine mit einem Farbstoff wie Coomassie-Blue sichtbar gemacht werden. Durch unterschiedliche Konzentrationen von Acrylamid und Bisacrylamid kann die Porengröße der Polyacrylamidgele variiert werden. In der vorliegenden Dissertation wurden entweder 16%ige Novex Tris-Glycin-Fertiggele der Firma Invitrogen oder 4-7,5%ige Gradientengele verwendet. Trenn- und Sammelgel der Gradientengele setzen sich aus folgenden Lösungen zusammen:

Lösung A:	30 % Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid
Lösung B:	1,5 M Tris; pH 8,8
Lösung C:	0,5 M Tris; 0,4 % SDS; pH 6,8
APS:	10 % Ammonium Persulfat (Sigma)
TEMED:	Tetramethylethyldiamin (SERVA)

Trenngel		
	leichte Lösung (4%)	schwere Lösung (7,5%)
Saccharose	-	0,84 g
Lösung A	0,7 ml	1,21 ml
Lösung B	1,32 ml	1,32 ml
Aqua Bidest	3,18 ml	2,26 ml
SDS (10%)	52,6 µl	52,6 µl
APS (10 %)	17,9 µl	17,9 µl
TEMED	1,8 µl	1,8 µl

Sammelgel (3 %)	
Lösung A	0,5 ml
Lösung C	1,25 ml
Aqua bidest	3,23 ml
APS (10 %)	60 µl
TEMED	15 µl

5.5.5 Coomassie-Blue-Färbung

Färbelösung:	Coomassie Stain Solution 1 × (Bio Rad)
Entfärbelösung:	60 % Methanol
	30 % Eisessig
	10 % Aqua bidest

Die im Gel aufgetrennten Proteine werden mindestens 1 Stunde mit Coomassie gefärbt, wodurch sie auch gleichzeitig fixiert werden. Die Entfärbung kann bis zu 24 Stunden dauern, wobei die Entfärbelösung mehrmals erneuert wird. Schon 0,1 µg eines Proteins ergeben eine erkennbare Bande bei einer Coomassie Blue-Färbung.

5.5.6 Proteinanalysen

5.5.6.1 Immunfluoreszenzfärbung

PBS-Dulbecco:	137 mM NaCl, 3 mM KCl, 16,5 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 90 mM CaCl ₂ , 50 mM MgCl ₂
Triton X 100:	0,5 % (Merck) in PBS Dulbecco
BSA:	2 % Bovines Serum Albumin, Fraktion V (frei von Immunglobulinen; Boehringer Mannheim) in PBS Dulbecco
α-Rec:	Kaninchen (Löwer et al., 1995), 1:200 bis 1:500 mit PBS verdünnt
α-HIVp24:	Maus, monoklonal, 1:200 verdünnt (Du Pont)
α-Kaninchen:	aus Ziege (FITC), 1:400 verdünnt (Cappel)
α-Kaninchen:	aus Esel (FITC), 1:25 bis 1:50 verdünnt (Amersham)
α-Maus:	aus Ziege (Cy3), 1:500 bis 1:1000 verdünnt (Dianova)
Objektträger:	Superfrost (Menzel)
Mowiol:	2,4 g Mowiol 40-88 (Aldrich) in 6 g Glycerol suspendieren, 6 ml Aqua bidest zugeben, 2 Stunden bei RT quellen lassen, 12 ml 0,2 M Tris/HCl (pH 8,5) zugeben, über Nacht unter Rühren lösen (evtl. bei 50 °C), bei 4.000 rpm 15 min abzentrifugieren, bei -20 °C lagern
Mikroskop:	Zeiss Axiophot

Nach der Fixierung (siehe 4.4.5) werden die Zellen für 15 min in Triton X100 permeabilisiert. Unspezifische Bindestellen werden bei einer 20-minütigen Inkubation in BSA bei 37 °C blockiert. Die Zellen werden 2 x mit je 5 ml PBS Dulbecco gewaschen und dann mit 100 µl einer Verdünnung der Antikörper gegen virale Proteine eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach werden die Zellen drei mal mit PBS Dulbecco gewaschen und

anschließend eine Stunde mit 100 µl einer Verdünnung der fluoreszenzmarkierten Antikörper im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem 3-maligem Waschen werden die Deckgläser in Mowiol auf den Objektträgern eingedeckt. Nachdem die Präparate 24 Stunden getrocknet sind, werden sie am Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung entsprechender Filter bei 630-facher Vergrößerung ausgewertet und mittels Digitalkamera photographiert.

5.5.6.2 Murex HIV Antigen Mab Test

Kit: Murex HIV Antigen Mab (Abbott)

Eine ausreichende Menge (ca. 2 - 10 µl) Zellysate werden für diesen Test eingesetzt. Der Test wird nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Mit Hilfe dieses Tests ist es möglich, die Zellysateproben auf das Vorhandensein des HIV-Gag-Proteins zu überprüfen. Hierfür sind die Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit humanen polyklonalen Antikörpern gegen HIV beschichtet. Die Zellysateproben werden in der Vertiefung zusammen mit den mit Biotin markierten monoklonalen anti-p24-Antikörpern inkubiert. Im folgenden Schritt bindet Biotin an das Streptavidin, ein Peroxidase-Konjugat. Bei der folgenden Inkubation mit Chromogen färbt sich die Lösung in der Vertiefung proportional zur Menge des gebundenen HIV-Antigens blau und wird gelb, sobald die Reaktion mit Schwefelsäure gestoppt wird.

Enthält die Probe kein HIV-Antigen, wird der markierte Antikörper nicht an die Vertiefung gebunden, und es entsteht keine oder nur eine sehr schwache Färbung im Hintergrund. Anschließend wird die Extinktion bei 450 nm gemessen.

5.5.6.3 Western Blot

5.5.6.3.1 Proteintransfer

Blotkammer:	TE Series Transfer Electrophoresis Unit (Hoefer Scientific Instruments)
Blotmembran:	Protran; Nitrocellulose Transfer Membrane (Schleicher und Schuell)
Blotpuffer:	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 15 % Methanol, pH 8,6
Filterpapier:	3 MM (Whatman)

Färbelösung:	Ponceau S (Sigma)
Blockierlösung:	10 % Magermilchpulver (Merck) in PBS mit 0,05 % Tween 20 (Sigma)
Waschlösung:	0,05 % Tween 20 (Sigma) in PBS (PBST)
α -Rec:	aus Kaninchen (Löwer et al., 1995), 1:2.000 in 5 % Magermilch/PBST verdünnt
α -Crm1:	aus Kaninchen (Paraskeva et al., 1999), 1:5000 in 5% Magermilch/PBST
α -Kaninchen:	aus Ziege, Peroxidase gekoppelt (Sigma), 1:20.000 in 5% Magermilch/PBST verdünnt
Detektion:	ECL plus Western Blotting Detection System (Amersham)
Röntgenfilme:	Hyperfilm ECL (Amersham)

Bei dieser Methode werden die Proteine aus der Gelmatrix auf eine Trägermembran (Nitrocellulose) mittels eines elektrischen Feldes transferiert (blotten). Das ursprüngliche im PAA-Gel erhaltene Trennmuster wird dabei 1:1 auf die Membran übertragen. Bei der angewandten Methode handelt es sich um einen „Nasstankblot“. Vor dem Blotten werden Schwamm, Filterpapier, Nitrocellulosemembran und Polyacrylamidgel in Transferpuffer äquilibriert, und der Blot in der in Abb. 4.2 abgebildeten Reihenfolge luftblasenfrei zusammengebaut.

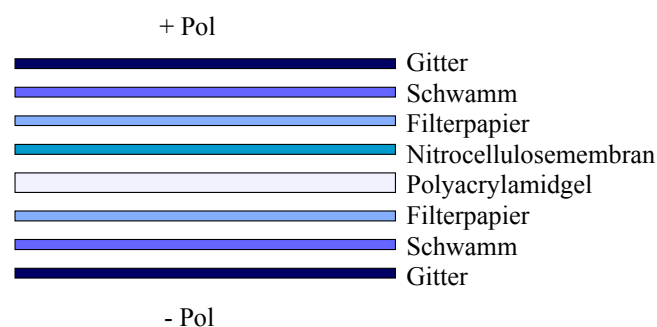


Abb. 5.2: Aufbau eines "Westernblot-Sandwiches"

Anschließend wird der Blot in den mit Transferpuffer gefüllten Tank eingesetzt und die Spannung angelegt. Die Transferzeit ist abhängig vom Molekulargewicht der Proteine. Für Rec beträgt die Blotdauer bei 50V und 4 °C 1,5 Stunden. Blotdauer und Spannungsstärke

sollten unbedingt eingehalten werden. Zur Überprüfung der Qualität des Proteintransfers kann die Nitrocellulosemembran mit Ponceau S angefärbt werden.

5.5.6.3.2 Proteinnachweis durch Antikörper

Auf der Membran können spezifische Proteine mittels Antikörper identifiziert werden. Dazu wird die Nitrocellulosemembran zunächst für 1h bei RT in einer Blockier-Lösung inkubiert, um mögliche unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Danach wird die Membran 1 x mit PBS+0,05% Tween 20 (PBST) gewaschen und anschließend eine Verdünnung des entsprechenden primären Antikörpers zugegeben. Die Inkubation erfolgt für 1h bei RT oder über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken, während dieser Zeit können die auf der Membran immobilisierten Proteine mit dem primären Antikörper reagieren. Danach wird die Membran erneut 4 x 5 min mit PBST gewaschen. Anschließend erfolgt für 1h die Inkubation mit dem sekundären Antikörper. Um nichtgebundenen sekundären Antikörper zu entfernen, wird die Membran erneut 4 x 5 min mit PBST gewaschen.

Der sekundäre Antikörper ist mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, die ein Substrat, Luminol, umsetzt. Das dabei emittierte Licht wird mittels eines Röntgenfilms nachgewiesen. Zur Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe wird die Membran mit einem 40:1 Gemisch aus ECL^{Plus}-Detektions-Lösung A und B gleichmässig überschichtet und 5 min im Dunkeln inkubiert. Danach lässt man die Detektions-Lösung gut von der Membran abtropfen. Anschließend wird die Membran luftblasenfrei verpackt und ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Expositionszeit beträgt zwischen 20s und 24h.

5.5.7 Immunpräzipitation

Sepharose:	Protein-G-Sepharose 4 Fast Flow (Amersham)
IP-Puffer I:	20 mM HEPES, pH7,3; 150 mM NaCl; 3 mM MgCl ₂ ; 0,1% NP40
IP-Puffer II:	20 mM HEPES, pH7,3; 150 mM NaCl; 3 mM MgCl ₂ ; 0,1% NP40; 2 mM Mercaptoethanol, 0,4% Magermilch
Ladepuffer:	3 x SDS Sample Puffer (Biolabs)
Präimmunserum:	Kaninchen

α -Rec: aus Kaninchen (Löwer et al., 1995)

Die Immunpräzipitation ist eine Methode, mit der Proteinkomplexe selektiv aus Zellen isoliert werden können. Die Analyse der präzipitierten Proteinkomplexe erfolgt mittels Western Blot. Um unspezifische Wechselwirkungen zwischen Protein und eingesetzter Sepharose sowie zwischen Protein und Antikörperlösung zu verhindern, wird zunächst ein geeignetes Volumen Zellysats (500 μ l) in ein Eppendorf-Gefäß überführt und mit 100 μ l Protein G Sepharose und einer geeigneten Menge (4 μ l) Präimmunserum bei 4°C für eine Stunde auf dem Rollrad vorinkubiert. Anschließend wird die Probe bei 12000 rpm für 20 sec abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 30-50 μ l Protein G Sepharose und einem geeigneten Volumen des entsprechenden Antikörpers (α -Rec: 6 μ l) versetzt und 2h unter Rotation bei 4°C inkubiert. Die Sepharose wird bei 12000 rpm für 20 sec zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, weggefroren und die Sepharose mit dem gebundenen Antigen-Antikörper-Komplex 4 x mit 1 ml IP-Puffer I/II gewaschen. An die einzelnen Waschschrte schließt sich jeweils ein 20-secündiger Zentrifugationsschritt bei 12000 rpm an. Die Sepharose wird anschließend mit einem geeigneten Volumen (30-50 μ l) Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 95°C aufgeköcht. Anschließend wird die Sepharose bei 12000 rpm, 20 sec abzentrifugiert. Die Proben können bei -20 °C aufbewahrt oder gleich im Western Blot analysiert werden.

5.6 RNA-Techniken

5.6.1 *In vitro* Transkription

Für die *in vitro* Transkription wird 2 μ g linearisierte DNA zu einem 50 μ l Ansatz, der 10 μ l 5-fach Transkriptionspuffer (Promega), 10 mM DTT, 10 Units RNasin, 10 μ l Nukleotidmix (rATP, rGTP, rCTP, rUTP; je 10 mM Stocklösung) und 10 Units T7-RNA-Polymerase enthält, zugegeben. Die Transkription findet bei der anschließenden Inkubation für 1 Stunde bei 37°C statt. Anschließend wird durch 15 min Inkubation bei 37°C mit 2 - 4 Units RQ1 DNase die DNA abgebaut. Es schließt sich eine Phenol-Chloroform-Aufreinigung und eine RNA-Fällung (siehe Fällung von DNA) an.

5.6.2 *In vitro* Transkription radioaktiv markierter Sondenmoleküle

Zur Herstellung von radioaktiv markierten Sondenmolekülen wird 0,5 µg linearisierte DNA zu einem 10 µl Gesamtansatz, der 2 µl 5-fach Transkriptionspuffer (Promega), 10 mM DTT, 2 Units RNasin, 2 µl Nukleotidmix (rATP, rGTP, rCTP, rUTP; je 10 mM Stocklösung), 500 µM CTP, 0,93 Mbq und 2 Units T7-Polymerase beinhaltet, zugegeben. Bei einer Inkubation von einer Stunde bei 30°C findet die *in vitro* Transkription statt. Anschließend wird bei einer Inkubation von 15 min bei 37°C durch Zugabe von 2 Units RQ1 DNase die DNA abgebaut. Nachdem der Ansatz mit TE-Puffer (pH 7,5) auf 100 µl aufgefüllt wurde, schließt sich eine Phenol-Chloroform-Aufreinigung an. Im folgenden wird die radioaktiv markierte RNA chromatographisch über eine Größenausschlußsäule (Amersham) gereinigt. Bei diesem Schritt werden die synthetisierten RNA-Stränge von den nichteingebauten, freien Nukleotiden getrennt. Hierfür wird Säule mit der radioaktiven Probe beladen. Die Elution erfolgte in drei nacheinander folgenden 400 µl Schritten mit TE-Puffer (pH 7,5). Die Fraktionen der austretenden, radioaktiven Moleküle werden aufgefangen und im Szintillationsmessgerät gemessen. Bis zum Gebrauch wird die aufgereinigte Sonde bei - 20°C aufbewahrt.

5.6.3 RNA-Gelshift Assay

Puffer:	50 mM CAPSO-Puffer; pH 9,7
	2,5 U Rnasin
	70 mM NaCl
	1 mM MgCl ₂
	30-50 ng BSA (bovine serum albumin)
	4% Glycerol
	20 µg Hefe tRNA
Ladepuffer (10x):	40 % Glycerol
	250 mM Tris-HCl; pH 7,5
6 % Polyacrylamidgel:	4 ml 10-fach TBE Puffer
	3 ml 2 % Bisacrylamid
	16 ml 30 % Acrylamid (Roth)
	2,5 ml 80 % Glycerol (Roth)
	add 80 ml DEPC-H ₂ O

450 µl 10 % Ammonium Persulfat (Sigma)

25 µl TEMED (SERVA)

Laufpuffer: 0,5x TBE Puffer

Der RNA-Gelshift Assay ist eine Methode mit der Protein-RNA Interaktionen nachgewiesen werden können.

Eine entsprechende Menge (9 - 36 ng) rekombinantes gereinigtes Protein wird in einem Endvolumen von 20 µl 1-fach Bindepuffer, der aus 50 mM CAPSO-Puffer (pH 9,7), 2,5 U RNasin, 70 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 30-50 ng BSA (bovine serum albumin), 4% Glycerol und 20 µg Hefe tRNA besteht, aufgenommen. Anschließend werden 40 ng der spezifischen *in vitro* transkribierten RNA (RcRE pCK30) oder 40 ng der unspezifischen RNA (LTR21) zugegeben. Bei einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur kann der spezifische oder unspezifische RNA-Kompetitor an das Protein binden. Anschließend werden 25.000 cpm der ³²P radioaktiv markierten RNA-Sonde zu dem Ansatz gegeben. Die Bindung der ³²P radioaktiv markierten RNA-Sonde an das Protein findet bei einer anschließenden 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur statt. Nach der Zugabe von 2 µl des 10-fach Ladepuffers wird der Ansatz auf ein natives 6%-iges Polyacrylamidgel aufgetragen, das vor der Beladung einem Vorlauf für 1 Stunde bei 100 V unterzogen wurde. Zur Auftrennung wird für 3 - 4 Stunden eine Spannung von 260 V angelegt. Das Gel wird nach der Auftrennung auf Filterpapier transferiert und im Gelrockner bei 80°C für 1,5 Stunden getrocknet. Die Detektion radioaktiver Banden erfolgt durch Exposition eines Phosphoimager-Screens für mindestens 10 min und anschließendem Einlesen der Daten in den Phosphoimager (FUJIX Bas1000). Zusätzlich wird ein Röntgenfilm auf das getrocknete Gel in einer Filmkassette aufgelegt, der nach 3 -12 Stunden entwickelt wird.

5.7 Klonierungen

5.7.1 Oligonukleotide (Primer)

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5'→3')
LRD1mutIs	gagccgccaactgcggcacaactaaag
LRD1mutIas	cttagttgtgccgcagttggcggtc
LRD1mutIIs	acttgggcacaagcaaagaagctgacg
LRD1mutIIas	cgtcagcttcttgccttgceccaagt
LRD1mutIIIs	caactaaagaaggcgacgcagttagct
LRD1mutIIIas	agctaactgcgccttctttagttg
LRD1mutIVs	aagctgacgcaggcagctacaaaatatctagag
LRD1mutIVas	ctctagatattttgtagctgcctgcgtcagctt
PET1	ggcagccat <u>atga</u> acccatcagagatg
PET2	gattagggatcctcatggcccgttctc
Recpet22asense	gattagggatcctggcccgttctc
JW20	atagaattccaatgaacccatcagagat
JW21	tatggatccgctggcccgttctcg
CH3	cccaagcttagttctacaatgaacccatcagag
CH4	atagggccctcgatcatcatggcc
srec/rex	tgctctagaccgttgactcacaagatg
asrec/rex	gcgggatactcaattctctttagttcc
srev/rex	tgctctagaccggagagacagagacagatc
asrev/rex	gcgggatactcaattctctttagttcc

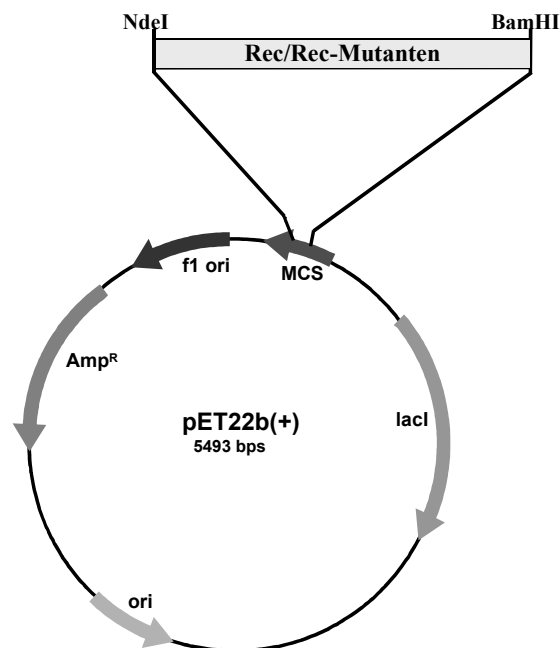
Die eingefügten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

5.7.2 Plasmide und Vektoren

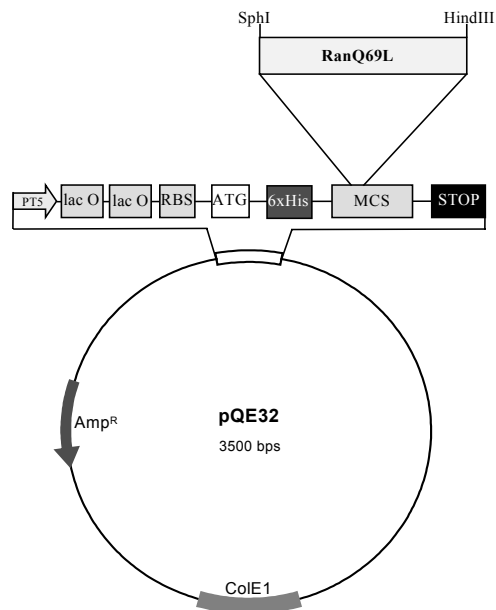
5.7.2.1 Verwendete Plasmide für die Expression bakterieller Proteine

5.7.2.1.1 pET22b (Novagen)

Die Transkription des *rec*- und mutierten *rec*-Gens erfolgt von einem T7-Promotor aus. Die Inserts wurden mittels PCR generiert (Primer PET1, PET2) und über die Schnittstellen NdeI, BamHI eingefügt. Am Ende der *rec*-Sequenz befindet sich ein Stopkodon, das über den Primer PET2 eingefügt wurde (siehe Oligonukleotide), dadurch wird eine N-terminale Fusion an den His-Tag verhindert.



5.7.2.1.2 pQE32 (Qiagen)



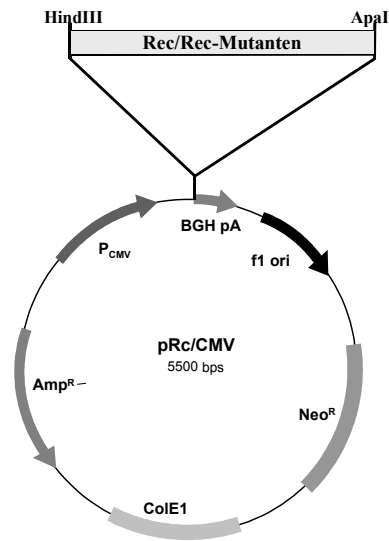
Der Vektor pQE32 enthält einen T5-Promotor. Die Klonierung des *ranq69l*-Gens über die Restriktionsschnittstellen SphI, HindIII führt zur Expression eines RanQ69L-Fusionsproteins mit N-terminaler His-Markierung.

5.7.2.1.3 pHIVgagRcRE

Der Vektor pHIVgagRcRE ist ein Derivat des Plasmids pCgagA2 (D'Agostino et al., 1992; Felber et al., 1989) und enthält als Promotor die HIV-1 LTR des Stammes NL-43, das HIV-1 *gag*-Gen und das HERV-K RcRE (Magin, 1997) sowie die 3'LTR des Stammes NL-43 als Transkriptionstermination. Das RcRE wurde über die Restriktionsschnittstellen Sac II Xho I in den Vektor eingebracht.

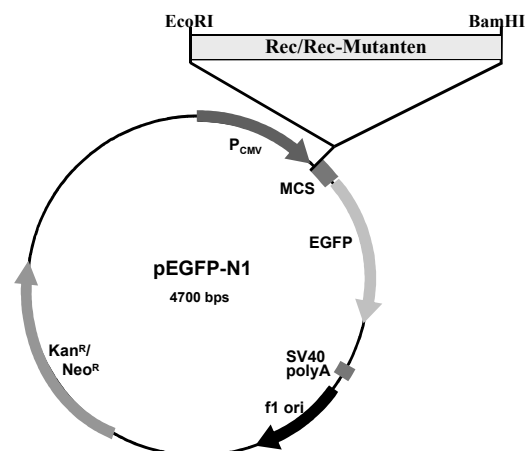
5.7.2.1.4 pRC/CMV (Invitrogen)

Der Vektor pRc/CMV, der im Text vereinfacht als pCMV bezeichnet wird, enthält den eukaryotischen CMV-Promotor, eine multiple Klonierungsstelle (MCS) und ein BGH-Polyadenylierungssignal. Die Inserts wurden über PCR (Primer: CH3, CH4) generiert und über die oben genannten Schnittstellen in den Vektor eingefügt. Über den Primer CH4 wurde ein Stopkodon am Ende der rec-Sequenz eingefügt.



5.7.2.1.5 pEGFP-N1 (Clontech)

Bei dem Vektor pEGFP-N1 befindet sich die multiple Klonierungsstelle (MCS) zwischen dem CMV Promotor und dem *egfp*-Gen. Die Klonierung des *rec*-Gens in die MCS führt zur Expression eines Rec-Fusionsproteins mit C-terminaler GFP-Markierung. Stromabwärts des *egfp*-Gens befindet sich ein SV40 Polyadenylierungssignal.



5.7.2.1.6 pRev

pRev ist ein Derivat des Plasmids pLsrev (Mermer et al., 1990). Er enthält ein synthetisches HIV-1 *rev*-Gen (Mermer et al., 1990) unter der Kontrolle des HIV-1 LTR-Promotors und ein SV40-Polyadenylierungssignal (D'Agostino et al., 1995)

5.7.2.1.7 pCFN

Der Vektor pCFN enthält den eukaryotischen CMV Promotor, die Sequenz des SV40 NLS und ein β Globin Polyadenylierungssignal. Die Klonierung der Rev-, Rex- und Rec-Fragmente über die Restriktionsschnittstellen XbaI, BamHI führt zur Expression eines chimären Proteins, das N-terminal das NLS von SV40 trägt.

6 Literaturverzeichnis

Ahmed, Y. F., Gilmartin, G. M., Hanly, S. M., Nevins, J. R., and Greene, W. C. (1991). The HTLV-I Rex response element mediates a novel form of mRNA polyadenylation. *Cell* 64, 727-737.

Ahmed, Y. F., Hanly, S. M., Malim, M. H., Cullen, B. R., and Greene, W. C. (1990). Structure-function analyses of the HTLV-I Rex and HIV-1 Rev RNA response elements: insights into the mechanism of Rex and Rev action. *Genes Dev* 4, 1014-1022.

Arrigo, S., and Beemon, K. (1988). Regulation of Rous sarcoma virus RNA splicing and stability. *Mol Cell Biol* 8, 4858-4867.

Askjaer, P., Jensen, T. H., Nilsson, J., Englmeier, L., and Kjems, J. (1998). The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. *J Biol Chem* 273, 33414-33422.

Askjaer, P., and Kjems, J. (1998). Mapping of multiple RNA binding sites of human T-cell lymphotropic virus type I rex protein within 5'- and 3'-Rex response elements. *J Biol Chem* 273, 11463-11471.

Atwater, J. A., Wisdom, R., and Verma, I. M. (1990). Regulated mRNA stability. *Annu Rev Genet* 24, 519-541.

Auer, M., Gremlich, H. U., Seifert, J. M., Daly, T. J., Parslow, T. G., Casari, G., and Gstach, H. (1994). Helix-loop-helix motif in HIV-1 Rev. *Biochemistry* 33, 2988-2996.

Ballaun, C., Farrington, G. K., Dobrovnik, M., Rusche, J., Hauber, J., and Bohnlein, E. (1991). Functional analysis of human T-cell leukemia virus type I rex-response element: direct RNA binding of Rex protein correlates with in vivo activity. *J Virol* 65, 4408-4413.

Boese, A., Galli, U., Geyer, M., Sauter, M., and Mueller-Lantzsch, N. (2001). The Rev/Rex homolog HERV-K cORF multimerizes via a C-terminal domain. *FEBS Lett* 493, 117-121.

Boese, A., Sauter, M., and Mueller-Lantzsch, N. (2000). A rev-like NES mediates cytoplasmic localization of HERV-K cORF. *FEBS Lett* 468, 65-67.

Bogerd, H. P., Echarri, A., Ross, T. M., and Cullen, B. R. (1998). Inhibition of human immunodeficiency virus Rev and human T-cell leukemia virus Rex function, but not Mason-Pfizer monkey virus constitutive transport element activity, by a mutant human nucleoporin targeted to Crm1. *J Virol* 72, 8627-8635.

Bogerd, H. P., Fridell, R. A., Benson, R. E., Hua, J., and Cullen, B. R. (1996). Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay. *Mol Cell Biol* 16, 4207-4214.

Bogerd, H. P., Fridell, R. A., Madore, S., and Cullen, B. R. (1995). Identification of a novel cellular cofactor for the Rev/Rex class of retroviral regulatory proteins. *Cell* 82, 485-494.

Bogerd, H. P., Huckaby, G. L., Ahmed, Y. F., Hanly, S. M., and Greene, W. C. (1991). The type I human T-cell leukemia virus (HTLV-I) Rex trans-activator binds directly to the HTLV-I Rex and the type 1 human immunodeficiency virus Rev RNA response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5704-5708.

Bogerd, H. P., Wiegand, H. L., Bieniasz, P. D., and Cullen, B. R. (2000a). Functional differences between human and bovine immunodeficiency virus Tat transcription factors. *J Virol* 74, 4666-4671.

Bogerd, H. P., Wiegand, H. L., Yang, J., and Cullen, B. R. (2000b). Mutational definition of functional domains within the Rev homolog encoded by human endogenous retrovirus K. *J Virol* 74, 9353-9361.

Boller, K., Frank, H., Löwer, J., Löwer, R., and Kurth, R. (1983). Structural organization of unique retrovirus-like particles budding from human teratocarcinoma cell lines. *J Gen Virol* 64 (Pt 12), 2549-2559.

Boller, K., König, H., Sauter, M., Mueller-Lantzsch, N., Löwer, R., Löwer, J., and Kurth, R. (1993). Evidence that HERV-K is the endogenous retrovirus sequence that codes for the human teratocarcinoma-derived retrovirus HTDV. *Virology* 196, 349-353.

Braun, I. C., Rohrbach, E., Schmitt, C., and Izaurralde, E. (1999). TAP binds to the constitutive transport element (CTE) through a novel RNA-binding motif that is sufficient to promote CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Embo J* 18, 1953-1965.

Bray, M., Prasad, S., Dubay, J. W., Hunter, E., Jeang, K. T., Rekosh, D., and Hammarskjöld, M. L. (1994). A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev-independent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1256-1260.

Cochrane, A. W., Golub, E., Volsky, D., Ruben, S., and Rosen, C. A. (1989). Functional significance of phosphorylation to the human immunodeficiency virus Rev protein. *J Virol* 63, 4438-4440.

Coffin, J. M. (1991). Retroviridae and their replication. In: "Fundamental Virology 2nd edition", Fields, B.N., and Knipe, D.M. (eds.), Raven Press, LTD., New York, pp. 645-708.

- Coffin, J. M. (1992).** Structure and classification of retroviruses. Vol.1", Levy, J.A. (ed), Plenum Press, New York, pp. 19-50.
- Cullen, B. R. (1998).** Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways. *Virology* 249, 203-210.
- D'Agostino, D. M., Ciminale, V., Pavlakis, G. N., and Chieco-Bianchi, L. (1995).** Intracellular trafficking of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein: involvement of continued rRNA synthesis in nuclear retention. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11, 1063-1071.
- D'Agostino, D. M., Felber, B. K., Harrison, J. E., and Pavlakis, G. N. (1992).** The Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 promotes polysomal association and translation of gag/pol and vpu/env mRNAs. *Mol Cell Biol* 12, 1375-1386.
- Denner, J., Phelps, R.C., Löwer, R., Löwer, J., and Kurth, R. (1995).** Expression of the human endogenous retrovirus HERV-K in tumor and normal tissue and antibody response in pregnant women, tumor and AIDS patients against HERV-K Gag and Env peptides. *AIDS Res* 11 (Suppl. 1), 103.
- Elfgang, C., Rosorius, O., Hofer, L., Jaksche, H., Hauber, J., and Bevec, D. (1999).** Evidence for specific nucleocytoplasmic transport pathways used by leucine-rich nuclear export signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6229-6234.
- Ernst, R. K., Bray, M., Rekosh, D., and Hammarskjold, M. L. (1997).** A structured retroviral RNA element that mediates nucleocytoplasmic export of intron-containing RNA. *Mol Cell Biol* 17, 135-144.
- Felber, B. K., Hadzopoulou-Cladaras, M., Cladaras, C., Copeland, T., and Pavlakis, G. N. (1989).** rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1495-1499.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., and Mattaj, I. W. (1997).** CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90, 1051-1060.
- Frendo, J. L., Olivier, D., Cheynet, V., Blond, J. L., Bouton, O., Vidaud, M., Rabreau, M., Evain-Brion, D., and Mallet, F. (2003).** Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol Cell Biol* 23, 3566-3574.
- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M., and Nishida, E. (1997).** CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* 390, 308-311.
- Golovkina, T. V., Chervonsky, A., Dudley, J. P., and Ross, S. R. (1992).** Transgenic mouse mammary tumor virus superantigen expression prevents viral infection. *Cell* 69, 637-645.

Gottifredi, V., and Prives, C. (2001). Molecular biology. Getting p53 out of the nucleus. *Science* 292, 1851-1852.

Grone, M., Hoffmann, E., Berchtold, S., Cullen, B. R., and Grassmann, R. (1994). A single stem-loop structure within the HTLV-1 Rex response element is sufficient to mediate Rex activity in vivo. *Virology* 204, 144-152.

Grüter, P., Tabernero, C., von Kobbe, C., Schmitt, C., Saavedra, C., Bachi, A., Wilm, M., Felber, B. K., and Izaurralde, E. (1998). TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Mol Cell* 1, 649-659.

Hakata, Y., Umemoto, T., Matsushita, S., and Shida, H. (1998). Involvement of human CRM1 (exportin 1) in the export and multimerization of the Rex protein of human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol* 72, 6602-6607.

Hartz, C. (2002). Regulation der Expression von HTDV/HER-K: Kartierung von Aminosäuren, die essentiell für den nukleären Import und die RNA-Bindung des Rec-Proteins sind. Diplomarbeit, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main.

Heger, P., Rosorius, O., Koch, C., Casari, G., Grassmann, R., and Hauber, J. (1998). Multimer formation is not essential for nuclear export of human T-cell leukemia virus type 1 Rex trans-activator protein. *J Virol* 72, 8659-8668.

Henderson, B. R., and Percipalle, P. (1997). Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. *J Mol Biol* 274, 693-707.

Hesse, J. (1998). cORF - Ein Shuttle-Protein? Analyse der Domänen von cORF, einem Regulatorprotein der humanen endogenen Retrovirusfamilie HERV-K. Diplomarbeit, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main.

Hope, T. J., Bond, B. L., McDonald, D., Klein, N. P., and Parslow, T. G. (1991). Effector domains of human immunodeficiency virus type 1 Rev and human T-cell leukemia virus type I Rex are functionally interchangeable and share an essential peptide motif. *J Virol* 65, 6001-6007.

Jaeger, J. A., Turner, D. H., and Zuker, M. (1989). Improved predictions of secondary structures for RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7706-7710.

Jordon, R. E., Rapini, R. P., Rex, I. H., Jr., Katz, H. I., Hickman, J. G., Bard, J. W., Medansky, R. S., Lew-Kaya, D. A., Sefton, J., DeGryse, R. E., and et al. (1990). Once-daily naftifine cream 1% in the treatment of tinea cruris and tinea corporis. *Int J Dermatol* 29, 441-442.

Kang, Y., Bogerd, H. P., Yang, J., and Cullen, B. R. (1999). Analysis of the RNA binding specificity of the human tap protein, a constitutive transport element-specific nuclear RNA export factor. *Virology* 262, 200-209.

Kang, Y., and Cullen, B. R. (1999). The human Tap protein is a nuclear mRNA export factor that contains novel RNA-binding and nucleocytoplasmic transport sequences. *Genes Dev* 13, 1126-1139.

Kjems, J., Brown, M., Chang, D. D., and Sharp, P. A. (1991). Structural analysis of the interaction between the human immunodeficiency virus Rev protein and the Rev response element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 683-687.

Kjems, J., Calnan, B. J., Frankel, A. D., and Sharp, P. A. (1992). Specific binding of a basic peptide from HIV-1 Rev. *Embo J* 11, 1119-1129.

Kjems, J., and Sharp, P. A. (1993). The basic domain of Rev from human immunodeficiency virus type 1 specifically blocks the entry of U4/U6.U5 small nuclear ribonucleoprotein in spliceosome assembly. *J Virol* 67, 4769-4776.

Kobayashi, K., Nakahori, Y., Miyake, M., Matsumura, K., Kondo-Iida, E., Nomura, Y., Segawa, M., Yoshioka, M., Saito, K., Osawa, M., *et al.* (1998). An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 394, 388-392.

Kutay, U., Izaurralde, E., Bischoff, F. R., Mattaj, I. W., and Gorlich, D. (1997). Dominant-negative mutants of importin-beta block multiple pathways of import and export through the nuclear pore complex. *Embo J* 16, 1153-1163.

Leib-Mösch, C., Haltmeier, M., Werner, T., Geigl, E. M., Brack-Werner, R., Francke, U., Erfle, V., and Hehlmann, R. (1993). Genomic distribution and transcription of solitary HERV-K LTRs. *Genomics* 18, 261-269.

Löwer, R. (1999). The pathogenic potential of endogenous retroviruses: facts and fantasies. *Trends Microbiol* 7, 350-356.

Löwer, R., Boller, K., Hasenmaier, B., Korbmacher, C., Muller-Lantzsch, N., Lower, J., and Kurth, R. (1993a). Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4480-4484.

Löwer, R., Löwer, J., Frank, H., Harzmann, R., and Kurth, R. (1984). Human teratocarcinomas cultured in vitro produce unique retrovirus-like viruses. *J Gen Virol* 65 (Pt 5), 887-898.

Löwer, R., Löwer, J., and Kurth, R. (1996). The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5177-5184.

Löwer, R., Löwer, J., Tondera-Koch, C., and Kurth, R. (1993b). A general method for the identification of transcribed retrovirus sequences (R-U5 PCR) reveals the expression of the human endogenous retrovirus loci HERV-H and HERV-K in teratocarcinoma cells. *Virology* 192, 501-511.

- Löwer, R., Tonjes, R. R., Korbmacher, C., Kurth, R., and Löwer, J. (1995).** Identification of a Rev-related protein by analysis of spliced transcripts of the human endogenous retroviruses HTDV/HERV-K. *J Virol* 69, 141-149.
- Madore, S. J., Tiley, L. S., Malim, M. H., and Cullen, B. R. (1994).** Sequence requirements for Rev multimerization in vivo. *Virology* 202, 186-194.
- Magin, C. (1997).** Untersuchungen zur Steuerung der Expression der humanen endogenen Retrovirusfamilie HERV-K. Doktorarbeit, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main.
- Magin, C., Hesse, J., Lower, J., and Lower, R. (2000).** Corf, the Rev/Rex homologue of HTDV/HERV-K, encodes an arginine-rich nuclear localization signal that exerts a trans-dominant phenotype when mutated. *Virology* 274, 11-16.
- Magin-Lachmann, C., Hahn, S., Strobel, H., Held, U., Lower, J., and Lower, R. (2001).** Rec (formerly Corf) function requires interaction with a complex, folded RNA structure within its responsive element rather than binding to a discrete specific binding site. *J Virol* 75, 10359-10371.
- Maldarelli, F., Martin, M. A., and Strebel, K. (1991).** Identification of posttranscriptionally active inhibitory sequences in human immunodeficiency virus type 1 RNA: novel level of gene regulation. *J Virol* 65, 5732-5743.
- Malim, M. H., Bohnlein, S., Hauber, J., and Cullen, B. R. (1989).** Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator--derivation of a trans-dominant repressor of Rev function. *Cell* 58, 205-214.
- Malim, M. H., and Cullen, B. R. (1991).** HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency. *Cell* 65, 241-248.
- Malim, M. H., McCarn, D. F., Tiley, L. S., and Cullen, B. R. (1991).** Mutational definition of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain. *J Virol* 65, 4248-4254.
- Mancuso, V. A., Hope, T. J., Zhu, L., Derse, D., Phillips, T., and Parslow, T. G. (1994).** Posttranscriptional effector domains in the Rev proteins of feline immunodeficiency virus and equine infectious anemia virus. *J Virol* 68, 1998-2001.
- Mann, D. A., Mikaelian, I., Zimmel, R. W., Green, S. M., Lowe, A. D., Kimura, T., Singh, M., Butler, P. J., Gait, M. J., and Karn, J. (1994).** A molecular rheostat. Co-operative rev binding to stem I of the rev-response element modulates human immunodeficiency virus type-1 late gene expression. *J Mol Biol* 241, 193-207.
- May, F. E., and Westley, B. R. (1986).** Structure of a human retroviral sequence related to mouse mammary tumor virus. *J Virol* 60, 743-749.

- McDonald, D., Hope, T. J., and Parslow, T. G. (1992).** Posttranscriptional regulation by the human immunodeficiency virus type 1 Rev and human T-cell leukemia virus type I Rex proteins through a heterologous RNA binding site. *J Virol* 66, 7232-7238.
- McNally, L. M., and McNally, M. T. (1996).** SR protein splicing factors interact with the Rous sarcoma virus negative regulator of splicing element. *J Virol* 70, 1163-1172.
- Mermer, B., Felber, B. K., Campbell, M., and Pavlakis, G. N. (1990).** Identification of trans-dominant HIV-1 rev protein mutants by direct transfer of bacterially produced proteins into human cells. *Nucleic Acids Res* 18, 2037-2044.
- Nasioulas, G., Zolotukhin, A. S., Tabernero, C., Solomin, L., Cunningham, C. P., Pavlakis, G. N., and Felber, B. K. (1994).** Elements distinct from human immunodeficiency virus type 1 splice sites are responsible for the Rev dependence of env mRNA. *J Virol* 68, 2986-2993.
- Nigg, E. A. (1997).** Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* 386, 779-787.
- Olsen, H. S., Cochrane, A. W., Dillon, P. J., Nalin, C. M., and Rosen, C. A. (1990).** Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein with a structured region in env mRNA is dependent on multimer formation mediated through a basic stretch of amino acids. *Genes Dev* 4, 1357-1364.
- Ono, M. (1986).** Molecular cloning and long terminal repeat sequences of human endogenous retrovirus genes related to types A and B retrovirus genes. *J Virol* 58, 937-944.
- Ossareh-Nazari, B., Bachelier, F., and Dargemont, C. (1997).** Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export. *Science* 278, 141-144.
- Ostertag, E. M., Goodier, J. L., Zhang, Y., and Kazazian, H. H., Jr. (2003).** SVA elements are nonautonomous retrotransposons that cause disease in humans. *Am J Hum Genet* 73, 1444-1451.
- Palmeri, D., and Malim, M. H. (1996).** The human T-cell leukemia virus type 1 posttranscriptional trans-activator Rex contains a nuclear export signal. *J Virol* 70, 6442-6445.
- Palmeri, D., and Malim, M. H. (1999).** Importin beta can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin alpha. *Mol Cell Biol* 19, 1218-1225.
- Paraskeva, E., Izaurralde, E., Bischoff, F. R., Huber, J., Kutay, U., Hartmann, E., Luhrmann, R., and Gorlich, D. (1999).** CRM1-mediated recycling of snurportin 1 to the cytoplasm. *J Cell Biol* 145, 255-264.

- Roth, J., and Dobbelstein, M. (1997).** Export of hepatitis B virus RNA on a Rev-like pathway: inhibition by the regenerating liver inhibitory factor IkappaB alpha. *J Virol* *71*, 8933-8939.
- Sakaguchi, K., Sakamoto, H., Xie, D., Erickson, J. W., Lewis, M. S., Anderson, C. W., and Appella, E. (1997).** Effect of phosphorylation on tetramerization of the tumor suppressor protein p53. *J Protein Chem* *16*, 553-556.
- Samuelson, L. C., Wiebauer, K., Snow, C. M., and Meisler, M. H. (1990).** Retroviral and pseudogene insertion sites reveal the lineage of human salivary and pancreatic amylase genes from a single gene during primate evolution. *Mol Cell Biol* *10*, 2513-2520.
- Sauter, M., Schommer, S., Kremmer, E., Remberger, K., Dolken, G., Lemm, I., Buck, M., Best, B., Neumann-Haefelin, D., and Mueller-Lantzsch, N. (1995).** Human endogenous retrovirus K10: expression of Gag protein and detection of antibodies in patients with seminomas. *J Virol* *69*, 414-421.
- Schwartz, S., Felber, B. K., Benko, D. M., Fenyo, E. M., and Pavlakis, G. N. (1990).** Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* *64*, 2519-2529.
- Schwartz, S., Felber, B. K., and Pavlakis, G. N. (1992).** Distinct RNA sequences in the gag region of human immunodeficiency virus type 1 decrease RNA stability and inhibit expression in the absence of Rev protein. *J Virol* *66*, 150-159.
- Segref, A., Sharma, K., Doye, V., Hellwig, A., Huber, J., Luhrmann, R., and Hurt, E. (1997).** Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)+ RNA and nuclear pores. *Embo J* *16*, 3256-3271.
- Stauber, R. H., Afonina, E., Gulnik, S., Erickson, J., and Pavlakis, G. N. (1998).** Analysis of intracellular trafficking and interactions of cytoplasmic HIV-1 Rev mutants in living cells. *Virology* *251*, 38-48.
- Steinhuber, S., Brack, M., Hunsmann, G., Schwelberger, H., Dierich, M. P., and Vogetseder, W. (1995).** Distribution of human endogenous retrovirus HERV-K genomes in humans and different primates. *Hum Genet* *96*, 188-192.
- Tan, R., Chen, L., Buettner, J. A., Hudson, D., and Frankel, A. D. (1993).** RNA recognition by an isolated alpha helix. *Cell* *73*, 1031-1040.
- Thomas, S. L., Hauber, J., and Casari, G. (1997).** Probing the structure of the HIV-1 Rev trans-activator protein by functional analysis. *Protein Eng* *10*, 103-107.
- Thomas, S. L., Oft, M., Jaksche, H., Casari, G., Heger, P., Dobrovnik, M., Bevec, D., and Hauber, J. (1998).** Functional analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein oligomerization interface. *J Virol* *72*, 2935-2944.

Tonjes, R. R., Limbach, C., Lower, R., and Kurth, R. (1997). Expression of human endogenous retrovirus type K envelope glycoprotein in insect and mammalian cells. *J Virol* 71, 2747-2756.

Tönjes, R. R., Limbach, C., Lower, R., and Kurth, R. (1997). Expression of human endogenous retrovirus type K envelope glycoprotein in insect and mammalian cells. *J Virol* 71, 2747-2756.

Unge, T., Solomin, L., Mellini, M., Derse, D., Felber, B. K., and Pavlakis, G. N. (1991). The Rex regulatory protein of human T-cell lymphotropic virus type I binds specifically to its target site within the viral RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7145-7149.

Van Brussel, M., Goubau, P., Rousseau, R., Desmyter, J., and Vandamme, A. M. (1996). The genomic structure of a new simian T-lymphotropic virus, STLV-PH969, differs from that of human T-lymphotropic virus types I and II. *J Gen Virol* 77 (Pt 2), 347-358.

Venkatesan, S., Gerstberger, S. M., Park, H., Holland, S. M., and Nam, Y. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 Rev activation can be achieved without Rev-responsive element RNA if Rev is directed to the target as a Rev/MS2 fusion protein which tethers the MS2 operator RNA. *J Virol* 66, 7469-7480.

Weichselbraun, I., Berger, J., Dobrovnik, M., Bogerd, H., Grassmann, R., Greene, W. C., Hauber, J., and Bohnlein, E. (1992). Dominant-negative mutants are clustered in a domain of the human T-cell leukemia virus type I Rex protein: implications for trans dominance. *J Virol* 66, 4540-4545.

Weis, K. (2002). Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking across the border. *Curr Opin Cell Biol* 14, 328-335.

Zapp, M. L., Hope, T. J., Parslow, T. G., and Green, M. R. (1991). Oligomerization and RNA binding domains of the type 1 human immunodeficiency virus Rev protein: a dual function for an arginine-rich binding motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7734-7738.

Zemmel, R. W., Kelley, A. C., Karn, J., and Butler, P. J. (1996). Flexible regions of RNA structure facilitate co-operative Rev assembly on the Rev-response element. *J Mol Biol* 258, 763-777.

Zuker, M. (1989). On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* 244, 48-52.

Zuker, M., and Stiegler, P. (1981). Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Res* 9, 133-148.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Verzweigungsstelle (branch site)
AAA	Polyadenylierungssignal
α	anti (für Antikörper)
as	Aminosäuren
APS	Ammoniumpersulfat
BGH	bovine growth hormone
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serum-Albumin
CA	Capsid Protein
cDNA	complementary Desoxyribonucleic Acid
CIP	Calf Intestinale Phosphatase
CMV	Cytomegalievirus
<i>rec</i>	regulator of expression encoded by <i>corf</i> (Gen)
Rec	regulator of expression encoded by <i>corf</i> (Protein)
CTE	Constitutive Transport Element
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	double strand DNA
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<i>env</i>	Envelope (Gen)
Env	Envelope (Protein)
ERV	endogenes Retro-Virus
FeLV	felines Leukämie-Virus
FIV	felines Immundefizienz-Virus
FKS	fötales Kälberserum

<i>gag</i>	gruppenspezifisches Antigen (Gen)
Gag	gruppenspezifisches Antigen (Protein)
<i>gag-pro-pol</i>	Gag-Protease-Polymerase (Gen)
GFP	Green Fluorescent Protein
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HERV	humanes endogenes Retro-Virus
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HTDV	human teratocarcinoma-derived virus particle
HTLV	humanes T-Zell Leukämie Virus
IAP	Intracisternales A-Typ Partikel
if	Immunfluoreszenz
<i>int</i>	Integrase (Gen)
IN	Integrase (Protein)
Ip	Immunpräzipitation
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani-Medium
LINE	Long Interspersed Element
LTR	Long Terminal Repeat
MA	Matrix Protein
MCS	multiple cloning site
MLV	murines Leukämie-Virus
MMTV	Maus Mamma Tumor-Virus
MPMV	Mason-Pfizer-Monkey-Virus
mRNA	messenger RNA
MuLV	murines Leukämie-Virus
NC	Nucleocapsid Protein
Nef	negative factor (Protein, HIV)
NES	nukleäres Export-Signal
NLS	nukleäres Lokalisations-Signal
NSP	Neomycin, Streptomycin, Penicillin
NRS	negative regulator of splicing
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte

p24	HIV Gag Capsidprotein
pA	Polyadenylierungssignal
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	periphere mononukleare Zellen
PBS	Primer Binding Site (im Virusgenom)
	phosphate buffered saline (in 4. Material und Methoden)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PKI	protein kinase inhibitor
<i>pol</i>	Polymerase / Reverse Transferase (Gen)
Pol	Polymerase / Reverse Transkriptase (Protein)
<i>pro / prt</i>	Protease (Gen)
PPT	Poly-Purin-Tract
PR	Protease (Protein)
prom	Promotor
R	Terminale Redundanz
Rab	rev/rex activation domain binding protein
<i>rev</i>	regulator of expression of virion proteins (Gen, HIV)
Rev	regulator of expression of virion proteins (Protein, HIV)
Rex	Rev-Analog von HTLV
RNA	Ribonucleic Acid
RcRE	regulatorisches cORF responsives Element
rpm	rounds per minute
RRE	Rev responsives Element
rRNA	ribosomal RNA
RSV	Rous-Sarkom-Virus
RT	Polymerase / Reverse Transferase (Protein)
RxRE	Rex responsives Element
SA	Spleiß-Akzeptor
<i>sag</i>	Superantigen Gen (MMTV)
SD	Spleiß-Donor
SDS	Sodium Dodecyl-Sulfat
SIV	simianes Immundefizienz-Virus
SINE	Short Interspersed Element
snRNA	small nuclear RNA

<i>src</i>	Onkogen von RSV
SRV	simianes Retro-Virus
SSV	simianes Sarkom-Virus
STLV	simianes T-Zell lymphotropes Virus
SU	Surface
SVA	SINE VNTR Alu
SV 40	simianes Virus 40
<i>tat</i>	transactivator of transcription (Gen, HIV)
Tat	transactivator of transcription (Protein, HIV)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TFIIIA	Transkriptionsfaktor IIIA
TM	Transmembran
tRNA	transfer RNA
U	Units
U3	Unique 3'End
U5	Unique 5'End
UTR	Untranslated Region
Vif	viral infectiosity factor (HIV)
Visna	Visna-Maedi-Virus
VLP	virus-like particles
Vpr	viral protein R (HIV)
Vpu	viral protein U (HIV)

Abkürzungen, die nur einmal verwendet werden, werden an Ort und Stelle erklärt. In den Fällen, in denen Aminosäuren abgekürzt werden, wird der Dreibuchstabencode verwendet. Standardabkürzungen physikalischer Einheiten sind hier nicht aufgeführt, ebenso wenig wie gängige Abkürzungen der deutschen Sprache.

7.2 Eigene Publikationen und Kongressbeiträge

Hahn, S., Magin-Lachmann, C., Hesse, J., Poleganov, M., Hartz, C., De-Zolt, S., Löwer, J. and Löwer, R. Deciphering the functional domains of the HTDV/HERV-K RNA export adaptor Rec. (in Vorbereitung)

Magin-Lachmann, C., Hahn, S., Strobel, H., Held, U., Löwer, J., and Löwer, R. (2001). Rec (formerly Corf) function requires interaction with a complex, folded RNA structure within its responsive element rather than binding to a discrete specific binding site. J Virol 75, 10359-10371.

Hahn, S., Magin-Lachmann, C., Hartz, C., Löwer, J., Löwer, R. (2002). Rec, the viral RNA Export Adaptor of the Endogenous Retrovirus HTDV/HERV-K. Vol. 1:T-20. 1st Workshop of the study group in the society for virology on the cell biology of viral infections: „FROM THE ENTRY TO THE PROGENY VIRUS“, Schloss Zeilitzheim.

Hahn, S., Löwer, J., Löwer, R. (2003). Rec, the RNA Export Adaptor of the Endogenous Retrovirus HTDV/HERV-K: Characterisation of Functional Domains. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie.

Hahn, S., Löwer, J., Löwer, R. (2004). Rec, the RNA Export Adaptor of the Endogenous Retrovirus HTDV/HERV-K. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie. Annual Meeting of the "Gesellschaft für Virologie" Joint Meeting with "Società Italiana di Virologia". Tübingen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Silvia Jutta Hahn
Geburtsdatum/-ort: 13.2.1975/ Marburg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

08/1981-07/1985 Grundschole Wehrda
08/1985-07/1991 Emil-von-Behring Schule (Grund-, Haupt- und Realschule) in Marburg
08/1991-06/1994 Martin-Luther-Schule (Gymnasium) in Marburg
6/94 Abitur

Studium:

10/1994-12/1999 Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg
10/1994-10/1996 Grundstudium
10/1996 Diplomvorprüfung
10/1996-12/1999 Hauptstudium
10/1998 Diplomhauptprüfung
11/1998-11/1999 Diplomarbeit im Fachgebiet Genetik am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Bölker

Thema: „Untersuchungen zur Funktion des hydrophoben Membranankers bei der Pheromonerkennung in *Ustilago maydis*“

12/1999 Abschluss des Studiums und Erreichen des akademischen Grades „Diplom-Biologin“

Promotion

seit 5/2000

Promotion am Paul-Ehrlich-Institut unter der Leitung von
Herrn Prof. Dr. J. Löwer und Frau Prof. Dr. R. Renkawitz-
Pohl (Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg)

Thema: „Das endogene Retrovirus HTDV/HERV-K:

Untersuchungen zur Funktion des akzessorischen
Proteins Rec“

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir durch ihre Unterstützung während meiner Doktorandenzeit die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben:

Herrn Prof. Dr. J. Löwer danke ich für die Vergabe des Themas und das stete Interesse am Fortgang der Arbeit.

Frau Prof. Dr. R. Renkawitz-Pohl danke ich sehr für die freundliche Übernahme der Betreuung dieser Arbeit im Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. R. Löwer für die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit und die stetige Bereitschaft zur Diskussion und Erörterung von Problemen.

Bei Herrn Dr. K. Boller bedanke ich mich für die Hilfe während meiner Analysen am Fluoreszenzmikroskop.

Bei Herrn Dr. H. König bedanke ich mich für die nützlichen methodischen Hilfestellungen.

Ein großes Dankeschön an Frau Dr. A. Damert und Herrn Dr. G. Schuhman für die letzten Korrekturen und hilfreichen Anregungen zu dieser Arbeit.

Bei Frau H. Strobel bedanke ich mich sehr für ihre ausgezeichnete Arbeit und die gute Zusammenarbeit.

Ein großes Dankeschön geht an alle jetzigen und ehemaligen Mitarbeiter des Sachgebietes PR2 und 2/04, die die Zeit im Labor sehr angenehm gemacht haben. Danke an: Pablo, Marco, Mathias, Ulrike, Annette, Heike, Christine M., Christina, Patricia, Dirk, Katja, Lili, Nora, Christian, Gerald, Ines, Christine, Christine P., Michael C., Micha N. ...
...und ganz besonders an Martin.

Bei Claus bedanke ich mich sehr für seine Unterstützung und Geduld.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht und mich jederzeit unterstützt und ermuntert haben.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**„Das endogene Retrovirus HTDV/HERV-K: Untersuchungen zur Funktion des
akzessorischen Proteins Rec“**

unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Renkawitz-Pohl (Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg) in Zusammenarbeit mit dem Paul-Ehrlich-Institut (Bundesamt für Sera und Impfstoffe) in Langen selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Frankfurt (Main), 20.02.2004
